

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003年11月13日 (13.11.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/093317 A1

(51) 国際特許分類: C07K 16/22, C12N
15/09, C12P 21/08, C12N 1/21, 5/10, A61K 39/395, A61P
3/10, 9/10, 13/12, 35/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP03/05505

(22) 国際出願日: 2003年4月30日 (30.04.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2002-129046 2002年4月30日 (30.04.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 協和
醗酵工業株式会社 (KYOWA HAKKO KOGYO CO.,
LTD.) [JP/JP]; 〒100-8185 東京都千代田区大手町一
丁目6番1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 設楽 研也 (SHI-
TARA, Kenya) [JP/JP]; 〒194-8533 東京都町田市旭町
3丁目6番6号 協和醗酵工業株式会社 東京研究
所内 Tokyo (JP). 中村 和靖 (NAKAMURA, Kazuyasu)
[JP/US]; 20852 メリーランド州 ノースベセスダ 5801
ニコルソンレーン アパートメント #416 MD (US). 古
谷 安希子 (FURUYA, Akiko) [JP/JP]; 〒194-8533 東京
都町田市旭町3丁目6番6号 協和醗酵工業株式会
社 東京研究所内 Tokyo (JP). 丹羽 倫平 (NIWA, Rinpei)
[JP/JP]; 〒194-8533 東京都町田市旭町3丁目6番6号

協和醗酵工業株式会社 東京研究所内 Tokyo (JP). 大木
祐二 (OHKI, Yuji) [JP/JP]; 〒194-8533 東京都町田市
旭町3丁目6番6号 協和醗酵工業株式会社 東京研
究所内 Tokyo (JP). 花井 陳雄 (HANAI, Nobuo) [JP/JP];
〒100-8185 東京都千代田区大手町一丁目6番1号
協和醗酵工業株式会社 本社内 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LV, MA, MD, MG, MN, MW, MX, MZ, NI, NO,
NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU,
ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,
GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 明細書とは別に規則13の2に基づいて提出された
生物材料の寄託に関する表示。

2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: ANTIBODY TO HUMAN INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR

(54) 発明の名称: ヒトインスリン様成長因子に対する抗体

(57) Abstract: To efficiently treat diseases such as cancer in which hIGF participates, there have been required antibodies which strongly bind to both of hIGF-I and hIGF-II and inhibit their functions and fragments of these antibodies. It is intended to provide antibodies which can specifically bind respectively to human IGF-I and human IGF-II to thereby inhibit the functions of human IGF-I and human IGF-II and have binding activity with a binding constant of $5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ or more measured with a biosensor BIACORE. It is also intended to provide diagnostics, preventives and remedies comprising the above antibodies for an hIGF-mediated disease and a disease showing pathological progressing due to abnormally accelerated hIGF production.

(57) 要約: hIGFが関与する癌などの疾患の効果的な治療のために、hIGF-IおよびhIGF-IIの両因子と強く結合し、それらの機能を阻害する抗体およびそれらの抗体断片が求められている。本発明は、ヒトIGF-IおよびヒトIGF-IIに特異的に結合し、ヒトIGF-IおよびヒトIGF-IIの機能を阻害する能力を有し、かつ、バイオセンサーバイオコアで測定される結合定数が $5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 以上の結合活性を有する抗体を提供する。さらに、該抗体を用いるhIGF介在性疾患および異常なhIGFの産生亢進により病態が進行する疾患の診断薬、予防薬および治療薬を提供する。

明 細 書

ヒトインスリン様成長因子に対する抗体

技術分野

本発明は、インスリン様成長因子 (insulin-like growth factor; 以下、IGF と表記する) に対する抗体およびそれら抗体に由来する抗体断片に関する。本発明はさらに、該抗体および抗体断片をコードする DNA に関する。本発明は、該 DNA を含んでなる組換えベクター、および該組換えベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換体に関する。本発明はさらに、該形質転換体を用いた該抗体および抗体断片の製造方法、ならびに該抗体および抗体断片の診断、予防および治療上の用途に関する。

背景技術

IGF は、乳房、前立腺、肺、結腸などの器官の上皮系細胞の増殖、分化、細胞死 (アポトーシス) の制御において非常に重要な役割を果たしている因子であり、その作用は、細胞表面に存在する IGF 受容体 (IGF receptor; 以下、IGF-R と表記する) を介して行われている (Endocrine Reviews, 16, 3-34, 1995)。また、IGF 結合蛋白質 (IGF-binding protein; 以下、IGFBP と表記する) と呼ばれる蛋白質が存在し、IGF の作用を促進的あるいは抑制的に制御していることが知られている (Endocrine Reviews, 16, 3-34, 1995)。

IGF には、IGF-I と IGF-II の 2 種類が存在し、いずれも一本鎖のポリペプチドからなっており、インスリンの前駆体であるプロインスリンとアミノ酸レベルで約 40% の相同性を有している (Advances in Cancer Research, 68, 183-223, 1996)。IGF-R には、インスリン受容体、IGF-I 受容体 (以下、IGF-IR と表記する)、IGF-II 受容体 (以下、IGF-IIR と表記する) の 3 種類が存在する。インスリン受容体と IGF-IR は、いずれもチロシンキナーゼ型受容体ファミリーに属しており、一本鎖の前駆体から蛋白質分解酵素による切断の結果生じる 135kDa の α サブユニットと

95kDa の β サブユニットが S-S 結合を形成し、さらに $\alpha_2\beta_2$ のヘテロ 4 量体の構造をとり、細胞膜上に存在している (Endocrine Reviews, 16, 143-163, 1995、Breast Cancer Research & Treatment, 47, 235-253, 1998)。インスリン受容体と IGF-IR は、約 60% の相同性を有しており、インスリンと IGF-IR、IGF とインスリン受容体も弱いながらも結合し、作用する (Journal of Biological Chemistry, 263, 11486-11492, 1988、Journal of Biological Chemistry, 268, 7393-7400, 1993)。インスリン受容体の $\alpha\beta$ サブユニットと IGF-IR の $\alpha\beta$ サブユニットからなるハイブリッド受容体の存在も確認されており、ハイブリッド受容体は、インスリンよりも IGF-I に対する結合親和性が高く、IGF-IR として機能していると考えられているが、生体内での役割は不明である (Endocrine Reviews, 16, 3-34, 1995、Endocrine Reviews, 16, 143-163, 1995)。IGF-IIR は、単鎖構造をしており、細胞外領域には、3 箇所のリガンド結合領域が存在する。リガンド結合領域の 1 箇所は、IGF-II 結合領域であり、他の 2 箇所は、マンノース-6-リン酸を含む蛋白質 [レニン、プロリフェリン、サイログロブリン、潜在型トランスフォーミング増殖因子(transforming growth factor- β ; TGF- β) など] と結合する領域である (Endocrine Reviews, 16, 3-34, 1995)。潜在型 TGF- β は、IGF-IIR への結合により活性化されることが報告されている (Breast Cancer Research & Treatment, 52, 175-184, 1998、Hormone & Metabolic Research, 31, 242-246, 1999)。IGF-IIR は、チロシンキナーゼ活性を有しておらず、IGF のうち、IGF-II のみと結合する。IGF-II は、IGF-IIR への結合により分解されることから、IGF-IIR は、IGF-II のアンタゴニストとして機能していると考えられている (Breast Cancer Research & Treatment, 52, 175-184, 1998)。

IGFBP は、これまでに 10 種類 (IGFBP-1 から IGFBP-10) が知られているが、そのうち 6 種類 (IGFBP-1 から IGFBP-6) が IGF に対して高い結合親和性を有している (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 94, 12981-12986, 1997)。IGFBP-1 から IGFBP-6 は、アミノ酸レベルで 40~60% の高い相同性を有している。IGFBP は、分解やリン酸化などの様々な翻訳後修飾を受け、IGF の運搬、分解の抑制、受容体への結合に影響を与え、IGF

の機能を調節していることが明らかとなっている (International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 28, 619-637, 1996、Endocrine Reviews, 18, 801-831, 1997)。IGFBP-1、IGFBP-2、IGFBP-3、IGFBP-5 は、IGF の作用を促進する場合と抑制する場合があり、IGFBP-2、IGFBP-3、IGFBP-5 の IGF に対する作用は IGFBP の分解によって、IGFBP-1 の作用は IGFBP-1 のリン酸化によって、それぞれ制御されている (Endocrine Reviews, 16, 3-34, 1995、International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 28, 619-637, 1996、Endocrinology & Metabolism Clinics of North America, 25, 591-614, 1996)。また、IGFBP-1、IGFBP-2、IGFBP-3、IGFBP-5 は、細胞膜上に存在するの特異的な受容体に結合すると、IGF との結合親和性が低下する。その結果、IGFBP と IGF とが解離し、遊離の IGF が生じる (Endocrine Reviews, 16, 3-34, 1995、International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 28, 619-637, 1996、Endocrinology & Metabolism Clinics of North America, 25, 591-614, 1996)。一方、IGFBP-4、IGFBP-6 は、IGF の作用を抑制する活性を有している (Endocrine Reviews, 16, 3-34, 1995、Endocrinology & Metabolism Clinics of North America, 25, 591-614, 1996)。生体内では、血中 IGF の 90%以上は、IGFBP-3 および酸不安定サブユニットと結合し、約 150kDa の高分子量複合体の形で存在しており、IGF の分解と血管外への流出が抑制されている (Journal of Biological Chemistry, 264, 11843-11848, 1989)。

IGF-I および IGF-II は、ともに多数の癌細胞 (肉腫、白血病、前立腺癌、乳癌、肺癌、結腸癌、胃癌、食道癌、肝臓癌、膵臓癌、腎臓癌、甲状腺癌、脳腫瘍、卵巣癌、子宮癌) に対して強い増殖促進作用を示し (British Journal of Cancer, 65, 311-320, 1992、Anticancer Research, 11, 1591-1595, 1991、Annals of Internal Medicine, 122, 54-59, 1995、Oncology, 54, 502-507, 1997、Endocrinology, 137, 1764-1774, 1996、European Journal of Haematology, 62, 191-198, 1999)、多くの癌細胞において IGF の過剰発現が確認されている (British Journal of Cancer, 65, 311-320, 1992)。また、高転移性癌細胞では、IGF-II および IGF-IR の発現が低転移性癌細胞よりも高いことが報告されている

(International Journal of Cancer, 65, 812-820, 1996)。このような IGF の作用は、主として IGF-IR を介しているが (Endocrinology, 136, 4298-4303, 1995、Oncogene, 28, 6071-6077, 1999)、乳癌細胞では、IGF-II がインスリン受容体を介して作用することも明らかにされている (Oncogene, 18, 2471-2479, 1999)。

前立腺上皮細胞で IGF-I を過剰発現するトランスジェニックマウスは、約 6 ヶ月で約 50% が前立腺癌を発症することが報告されている (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 97, 3455-3460, 2000)。また、マウスでのヒト前立腺癌細胞移植モデルにおいて、アンドロゲン非依存性増殖能の獲得に伴い、IGF-I および IGF-IR の発現が上昇することが示されている (Cancer Research, 61, 6276-6280, 2001)。

IGF は、また、他の因子と相互作用し、癌細胞の増殖に関与している。乳癌細胞では、エストロゲンにより、IGF-I の作用が増強され、かつ、IGF-I および IGF-IR の発現が誘導されることが報告されている (Endocrinology, 136, 1296-1302, 1995、Journal of Biological Chemistry, 265, 21172-21178, 1990、Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology, 41, 537-540, 1992、British Journal of Cancer, 75, 251-257, 1997)。また、エストロゲンは、乳癌細胞における IGFBP の産生を抑制すること、IGF-IR の発現を減少させること、IGFBP 分解酵素の発現を増加させることが知られている (Biochemical & Biophysical Research Communications, 193, 467-473, 1993、Molecular Endocrinology, 5, 815-822, 1991)。

逆に、IGF-I がエストロゲン受容体の発現を増強させること (Endocrinology, 127, 2679-2686, 1990、Journal of Cellular Biochemistry, 52, 196-205, 1993)、乳癌細胞において、IGF-I、IGF-II がエストロンスルフェイトをエストロンに加水分解するエストロンスルファターゼ活性を増加させることも報告されている (International Journal of Molecular Medicine, 4, 175-178, 1999)。

さらに、IGF は上皮細胞増殖因子 (epidermal growth factor; 以下、EGF と表記する) と協調的に作用する。頸癌細胞では、EGF は、IGF-II の発現を増加させ、さらに、IGF は、EGF の増殖促進作用を増強させる (Proceedings of the National

Academy of Sciences of the United States of America, 92, 11970-11974, 1995、Cancer Research, 56, 1761-1765, 1996)。EGF は IGFBP-3 の発現を抑制することで遊離の IGF 量を増加させ、増殖促進作用を増強することも知られている (Cancer Research, 54, 3160-3166, 1994)。

いくつかの抗細胞増殖活性を有する因子の作用が、IGF の増殖促進作用を抑制することにより、発揮されていることが知られている。TGF- β やレチノイン酸による乳癌細胞の増殖抑制作用は、IGFBP-3 の発現誘導の結果、IGF の作用が抑制されることによって発揮される (Journal of Biological Chemistry, 270, 13589-13592, 1995、Cancer Research, 56, 1545-1550, 1996、Endocrinology, 136, 1219-1226, 1995)。また、ビタミン D およびその合成誘導体は、IGF の乳癌細胞や前立腺癌細胞に対する増殖促進作用を抑制するが、その作用は IGFBP の発現上昇および IGF-IR、IGF-II の発現抑制に基づいている (Journal of the National Cancer Institute, 89, 652-656, 1997、Journal of Molecular Endocrinology, 20, 157-162, 1998、Journal of Endocrinology, 154, 495-504, 1997、International Journal of Oncology, 13, 137-143, 1998)。

腫瘍抑制遺伝子産物も IGF の作用に影響を与えることが報告されている。例えば、肉腫細胞などでは、野生型 p53 蛋白質は IGFBP-3 の発現を誘導する一方、IGF-II および IGF-IR の発現を抑制する (Nature, 377, 646-649, 1995、Cancer Research, 56, 1367-1373, 1996、DNA & Cell Biology, 17, 125-131, 1998、Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 93, 8318-8323, 1996、Endocrinology, 139, 1101-1107, 1998)。逆に、乳癌細胞では、IGF-I の作用により p53 蛋白質がリン酸化されて、核から細胞質へ移行することにより、p53 蛋白質の機能が損なわれることが知られている (International Journal of Cancer, 55, 453-458, 1993)。その他、ウィルムス腫瘍抑制遺伝子産物 WT1 により、IGF-IR の発現が抑制されること (Journal of Biological Chemistry, 269, 12577-12582, 1994、Endocrinology, 140, 4713-4724, 1999)、IGF-I により、乳腺由来増殖阻害因子 (mammary-derived growth inhibitor;

MDGI) の発現が抑制されること (International Journal of Oncology, 13, 577-582, 1998) が報告されている。

エネルギー摂取などのライフスタイルと発癌との関係は、古くから注目されてきたが、種々の動物実験から、エネルギー摂取と IGF の発現、さらに発癌が密接な関係を有していることが明らかにされつつある。前立腺癌を移植されたラットでは、エネルギー摂取を制限すると癌の増殖が抑制され、さらにアポトーシスが誘導される。この効果は、血中 IGF-I 濃度の減少と相関している (Journal of the National Cancer Institute, 91, 512-523, 1999)。同様の結果は、乳癌移植マウスでも報告され、さらに、IGF-I の投与により増殖抑制作用が認められなくなることからも、エネルギー摂取の制限による癌の増殖抑制においては、IGF-I が主要な役割を果たしていることが示唆されている (Cancer Research, 57, 4667-4672, 1997)。

IGF と癌との関連性は、臨床的および疫学的な研究からも検討されている。乳癌患者では、血漿および血清中の IGF-I 濃度が健常者に比べて高いこと (European Journal of Cancer, 29A, 492-497, 1993、Tumori, 80, 212-215, 1994)、乳癌組織では、正常組織に比べて、IGF-IR の量が 10 倍高いこと (Cancer Research, 53, 3736-3740, 1993) が報告されている。また、乳癌患者の約 30%では、IGF-IIR 遺伝子にヘテロ接合性の消失 (Loss of heterozygosity) が認められ、IGF-IIR 遺伝子は癌抑制遺伝子としての機能が示唆されている (Breast Cancer Research & Treatment, 47, 269-281, 1998)。結腸癌患者では、血清中の IGF-II、IGFBP-2、IGFBP-3 の濃度が健常者に比べて高いことが報告されている (International Journal of Cancer, 57, 491-497, 1994)。また、結腸癌に進行することが知られている結腸腺腫の患者は、IGF-II および IGFBP-2 の血清中濃度が高いが、腺腫の切除により、それらの濃度が低下することが示されている (Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 85, 3402-3408, 2000)。胃癌組織では、IGF-II の過剰発現が報告されている (European Journal of Cancer, 37, 2257-2263, 2001)。閉経後の子宮内膜癌患者では、健常者に比べて血清中の IGF-I 濃度が高く、IGFBP-1 濃度が低い。一方、IGFBP-3 濃度には差は認められなかったことが報告さ

れている (Endocrine Journal, 44, 419-424, 1997)。前立腺癌患者では、血清中の IGF-I および IGFBP-2 濃度が高く、IGFBP-3 濃度が低いこと (British Journal of Cancer, 76, 1115-1118, 1997、Urology, 54, 603-606, 1999、Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 76, 1031-1035, 1993、Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 77, 229-233, 1993)、癌組織においては、IGF-II、IGFBP-2、IGFBP-4、IGFBP-5 の産生が亢進しており、IGFBP-3 の産生が抑制されていること (Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 81, 3774-3782, 1996、Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 81, 411-420, 1996、Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 81, 3783-3792, 1996) が報告されている。IGF-I および IGFBP 発現の同様の变化は、卵巢癌患者の血清および癌組織においても観察されている (Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 78, 271-276, 1994、Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 82, 2308-2313, 1997、British Journal of Cancer, 73, 1069-1073, 1996)。

いくつかの疫学的研究から、IGF および IGFBP と癌の罹患危険率に関連性があることが明らかとなっている。乳癌、結腸癌、直腸癌、前立腺癌、肺癌などの固形癌においては、罹患危険率の高さと血中の IGF-I 濃度の高さおよび IGFBP-3 濃度の低さが正の相関を示すこと、小児性白血病では、罹患危険率の高さと IGFBP-3 濃度の低さが正の相関を示すこと、さらに、乳癌では、罹患危険率の高さと IGF-I と IGFBP-3 の濃度比 (IGF-I/IGFBP-3) の高さが正の相関を示すことが報告されている (Lancet, 351, 1393-1396, 1998、Science, 279, 563-566, 1998、Journal of the National Cancer Institute, 91, 620-625, 1999、Journal of the National Cancer Institute, 91, 151-156, 1999、International Journal of Cancer, 62, 266-270, 1995、Epidemiology, 9, 570-573, 1998、Breast Cancer Research & Treatment, 47, 111-120, 1998、International Journal of Cancer, 83, 15-17, 1999、International Journal of Cancer, 80, 494-496, 1999、British Journal of Cancer, 76, 1115-1118, 1997)。

IGF と癌の予後の関連性についても、報告がある。乳癌では、エストロゲン受容体あるいはプロゲステロン受容体が陽性の組織において IGF-IR の発現が増加していることが報告されている (Cancer Research, 52, 1036-1039, 1992)。また、IGF-IR の発現により、予後が不良となることを報告している例もある (Cancer Research, 57, 3079-3083, 1997、Cancer, 58, 1159-1164, 1998)。組織内のエストロゲン受容体発現と IGFBP-3 発現が逆相関することも報告されている (Cancer Research, 52, 5100-5103, 1992、Journal of Cellular Biochemistry, 52, 196-205, 1993)。

また、糖尿病性網膜症や糖尿病性腎症などのような、糖尿病性合併症においては、IGF 作用の異常亢進が認められている (Science, 276, 1706-1709, 1997、American Journal of Physiology, 274, F1045-F1053, 1998)。

さらに、リウマチ滑膜において IGF-I の局所的発現が認められること、リウマチ性関節炎の病態形成に IGF-I が関与していることも報告されている (Arthritis & Rheumatism, 32, 66-71, 1989、Journal of Rheumatology, 22, 275-281, 1995、Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 81, 150-155, 1996、Arthritis & Rheumatism, 39, 1556-1565, 1996)。

以上のように IGF-I および IGF-II を含めた IGF ファミリー蛋白質 (IGF、IGF-R、IGFBP) は、癌の発生、増殖、さらには、糖尿病性合併症やリウマチ性関節炎などにおいても重要な役割を果たしている。これらの事実は、IGF ファミリー蛋白質を標的とした癌、糖尿病性合併症、リウマチ性関節炎などの診断、予防、治療の可能性を示唆している。

実際、IGF-IR に対するアンチセンス RNA を発現させることで、高転移性のヒト乳癌細胞のマウスでの造腫瘍性および転移性が低下し、生存期間の延長が認められること (Cancer Gene Therapy, 7, 384-395, 2000)、抗 IGF-IR 抗体により、マウスに移植されたヒト横紋筋肉腫細胞やヒト乳癌細胞の増殖が抑制されること

(Cancer Research, 54, 5531-5534, 1994、Journal of Clinical Investigation, 84, 1418-1423, 1989、Breast Cancer Research & Treatment, 22, 101-106, 1992)、など IGF 作用を抑制することによる抗腫瘍効果が報告されている

(*Biochimica et Biophysica Acta*, 1332, F105-F126, 1997)。その一方で、抗 IGF-IR 抗体では、マウスに移植されたエストロゲン非依存性増殖を示すヒト乳癌細胞の生着は抑制するものの、エストロゲン依存性増殖を示すヒト乳癌細胞の生着や生着したヒト乳癌細胞の増殖は抑制されないことが示されており、IGF-IR の作用阻害のみでは、十分な抗腫瘍効果が得られないことも示唆されている (*Breast Cancer Research & Treatment*, 22, 101-106, 1992)。

IGF に対する抗体 (以下、抗 hIGF 抗体と表記する) としては、既にいくつかの抗体が知られている。代表的なヒト IGF-I に対する抗体 (以下、抗 hIGF-I 抗体と表記する) としては、sm1.2 が報告されている (*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81, 2389-2392, 1984)。sm1.2 は、hIGF-II と 40% 程度の交差反応性を有していること、1~2 $\mu\text{g/mL}$ の濃度でウェスタンブロッティング法により、100ng の hIGF-I を検出可能であること、10~30 $\mu\text{g/mL}$ の濃度で 20ng/mL の hIGF-I によるマウス繊維芽細胞株 BALB/c3T3 の増殖を阻害することが明らかとなっている (*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81, 2389-2392, 1984、*Journal of Clinical Investigation*, 99, 2961-2970, 1997)。

その他、抗 hIGF-I 抗体としては、Val⁵⁹-SmC121 があり、該抗体は、ヒトインスリンおよび hIGF-II とは反応しないこと、hIGF-I の 10~12 番目の Leu-Val-Asp を含むペプチドを認識すること、¹²⁵I-hIGF-I を用いたラジオイムノアッセイでは、1ng/mL の hIGF-I の検出感度を示したことが報告されている (*Journal of Endocrinology*, 125, 327-335, 1990)。

抗 hIGF-I 抗体 41/81 は、hIGF-II とは 3% の交差反応性を有しており、また、¹²⁵I-hIGF-I を用いたラジオイムノアッセイでは、1ng/mL の hIGF-I の検出感度を示した (*FEBS Letters*, 149, 109-112, 1982)。

抗 hIGF-I 抗体 35I17 は、hIGF-II と 0.5% 程度の交差反応性を有していること、1 $\mu\text{g/mL}$ の濃度でウェスタンブロッティング法により、1 μg の hIGF-I を検出可能であること、12 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で hIGF-I によるマウス繊維芽細胞株 BALB/c3T3 の増殖を完全に阻害すること、30 $\mu\text{g/mL}$ の濃度で 1 $\mu\text{g/mL}$ の hIGF-I による hIGF-IR

の自己リン酸化を阻害すること、また、 ^{125}I -hIGF-I を用いたラジオイムノアッセイでは、0.1nM の hIGF-I の検出感度を示すことが報告されている (Hybridoma, 16, 513-518, 1997)。

抗 hIGF-I 抗体 BPL-M23 は、hIGF-I に対して $10.5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ の結合活性を示し、一方、hIGF-II およびヒトインスリンには、それぞれ 0.8% および 0.0001% の交差反応性を示すこと、ヤギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、ウサギの IGF とは反応性を示すが、ラットおよびマウスの IGF とは反応しないこと、ラット脂肪細胞に対する hIGF-I による脂肪形成を抑制することが報告されている (Journal of Molecular Endocrinology, 2, 201-206, 1989)。

抗 hIGF-I 抗体 7A1、1B3、4C1、5A7 は、hIGF-I の C および D ドメインの異なるエピトープを認識すること、hIGF-II とはそれぞれ 6.6%、0.83%、12%、1.2% の交差反応性を示すことが報告されている (Hybridoma, 12, 737-744, 1993)。

3D1/2/1 は、ヒトおよびモルモットの IGF-I とは反応を示すが、ウサギ、ラット、マウスの IGF-I とは反応しないこと、hIGF-II とは、7% の交差反応性を示すことが報告されている (Journal of Clinical and Metabolism, 54, 474-476, 1982)。

代表的なヒト IGF-II に対する抗体 (以下、抗 hIGF-II 抗体と表記する) としては、S1F2 が報告されている。S1F2 は、hIGF-I と 10% 程度の交差反応性を有していること、 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度でウェスタンブロッティング法により、10~100ng の hIGF-II を検出可能であること、 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で 100ng/mL の hIGF-II によるヒト繊維芽細胞の DNA 合成促進作用を阻害することが明らかとなっている (Diabetes Research and Clinical Practice, 7, S21-S27, 1989、Endocrinology, 124, 870-877, 1989)。

抗 hIGF-II 抗体 2H11、2B11、ID5、ID9 は、hIGF-II と反応し、hIGF-I とは反応しないこと、競合酵素免疫測定法 (以下、ELISA と表記する) により、 $1 \text{ ng}/\text{mL}$ の hIGF-II を定量可能であることが報告されている (特開平 5-252987)。

また、ヒト以外の動物の抗体、例えば、マウス抗体をヒトに投与すると、異物として認識されることにより、ヒト体内にマウス抗体に対するヒト抗体 (Human Anti Mouse Antibody : 以下、HAMA と表記する) が誘導されることが知られている。

HAMA は投与されたマウス抗体と反応して、副作用を惹起することや (Journal of Clinical Oncology, 2, 881-891, 1984; Blood, 65, 1349-1363, 1985; Journal of the National Cancer Institute, 80, 932-936, 1988; Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 82, 1242-1246, 1985)、投与されたマウス抗体の体内からの消失を速め (Journal of Nuclear Medicine, 26, 1011-1023, 1985; Blood, 65, 1349-1363, 1985; Journal of the National Cancer Institute, 80, 937-942, 1988)、マウス抗体の治療効果を減じてしまうことが知られている (Journal of Immunology, 135, 1530-1535, 1985; Cancer Research, 46, 6489-6493, 1986)。

これらの問題点を解決するため、遺伝子組換え技術を利用してヒト以外の動物の抗体をヒト型キメラ抗体あるいはヒト型相補性決定領域 (以下、CDR と表記する) 移植抗体などのヒト化抗体にすることが試みられている。ヒト型キメラ抗体とは、抗体の可変領域 (以下、V 領域と表記する) がヒト以外の動物の抗体で、定常領域 (以下、C 領域と表記する) がヒト抗体である抗体であり (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 81, 6851-6855, 1984)、ヒト型 CDR 移植抗体とは、ヒト以外の動物の抗体の V 領域中の CDR のアミノ酸配列をヒト抗体の適切な位置に移植した抗体である (Nature, 321, 522-525, 1986)。これらのヒト化抗体は、マウス抗体などのヒト以外の動物の抗体に比較してヒトへの臨床応用上、様々な利点を有している。例えば、免疫原性および血中での安定性に関しては、ヒト型キメラ抗体では、ヒトに投与した場合、マウス抗体に比べて血中半減期が約 6 倍伸びたことが報告されている (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 86, 4220-4224, 1989)。ヒト型 CDR 移植抗体においても、サルを用いた実験でマウス抗体に比べ免疫原性が低下し、血中半減期が延長したことが報告されている

(Cancer Research, 56, 1118-1125, 1996; Immunology, 85, 668-674, 1995)。
即ち、ヒト化抗体は、ヒト以外の動物の抗体に比べ、副作用が少なく、その治療効果が長期間持続することが期待される。また、ヒト化抗体は、遺伝子組換え技術を利用して作製するため、様々な形態の分子として作製することができる。例えば、

ヒト抗体の重鎖（以下、H鎖と表記する）C領域として $\gamma 1$ サブクラスを使用すれば、血中で安定、かつ、抗体依存性細胞障害活性などのエフェクター活性の高いヒト化抗体を作製することができる（Cancer Research, 56, 1118-1125, 1996）。エフェクター活性の高いヒト化抗体は、癌などの標的の破壊が望まれる場合には、極めて有用である。一方、単に標的を中和する作用のみが必要とされる場合や、エフェクター活性による標的の破壊による副作用が懸念される場合には、ヒト抗体のH鎖C領域として $\gamma 4$ サブクラスを使用すれば、 $\gamma 4$ サブクラスは一般的にエフェクター活性が低いため（Journal of Experimental Medicine, 166, 1351-1361, 1987; Journal of Experimental Medicine, 168, 127-142, 1988）、副作用を回避でき、かつ、マウス抗体に比べ血中半減期の延長が期待される（Immunology, 85, 668-674, 1995）。さらに、最近の蛋白質工学、遺伝子工学の進歩により、ヒト化抗体を含めた抗体から Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv（Science, 242, 423-426, 1988）、dsFv（Molecular Immunology, 32, 249-258, 1995）、CDRを含むペプチド（Journal of Biological Chemistry, 271, 2966-2971, 1996）などのより分子量の小さい抗体断片の作製が可能となっている。これらの抗体断片は、完全な抗体分子に比べ分子量が小さい為、標的組織への移行性に優れている（Cancer Research, 52, 3402-3408, 1992）。

以上のことから、癌の発生、増殖、さらには、糖尿病性合併症やリウマチ性関節炎において、重要な役割を果たしている IGF ファミリー蛋白質はインスリン、IGF-I および IGF-II の増殖因子とインスリン受容体、IGF-IR および IGF-IIR の受容体、ならびに IGFBP が複雑に絡み合って疾患を制御している。すなわち、これらの相互作用の一部を阻害しても疾患を完全に抑制することは困難である。治療薬として有用と考えられる IGF-I および／あるいは IGF-II を認識する抗体は、多数報告があるが、IGF-I および IGF-II と強く結合して、IGF-I および IGF-II の機能を同時に阻害できる抗体の報告はない。

また、ヒトへの臨床応用に用いる抗体としては、ヒト化抗体の方がマウス抗体などのヒト以外の動物の抗体より望ましい。しかし、抗 hIGF 抗体に関してヒト化抗

体などの遺伝子組換え抗体の作製の報告、さらには、それらの抗体断片の報告はない。

発明の開示

hIGF ファミリーが介在する細胞増殖は、多くの癌細胞で機能していることが知られており、hIGF が介在する情報伝達を阻害できれば、ヒトにおける固形腫瘍の増殖、転移形成、糖尿病性合併症、リウマチ性関節炎等の疾患の治療に有用であることが期待される。

本発明の目的は、hIGF ファミリーが介在する情報伝達を遮断し、IGF による細胞増殖を阻害する物質を取得し、さらに該物質の利用方法を提供することである。

本発明は、以下の (1) ~ (24) に関する。

(1) ヒト IGF-I およびヒト IGF-II に特異的に結合し、ヒト IGF-I およびヒト IGF-II の機能を阻害する能力を有し、かつ、バイオセンサーピアコアで測定される結合定数が $5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 以上の結合活性を有する抗体またはその抗体断片。

(2) ヒト IGF-I に対する結合活性とヒト IGF-II に対する結合活性とが同程度である (1) に記載の抗体またはその抗体断片。

(3) 抗体またはその抗体断片の重鎖可変領域 (VH) の CDR1、CDR2 および CDR3 が、それぞれ配列番号 5、6 および 7、および/または軽鎖可変領域 (VL) の CDR1、CDR2 および CDR3 が、それぞれ配列番号 8、9 および 10 で示されるアミノ酸配列を含む、(1) または (2) に記載の抗体またはその抗体断片。

(4) 抗体が、ヒト以外の動物の抗体または遺伝子組換え抗体である、(1) ~ (3) のいずれか1項に記載の抗体またはその抗体断片。

(5) 遺伝子組換え抗体が、ヒト型キメラ抗体、ヒト型CDR移植抗体およびヒト抗体からなる群から選ばれる、(4) に記載の抗体またはその抗体断片。

(6) ヒト以外の動物の抗体の VH が配列番号 2、および/または VL が配列番号 4 で示されるアミノ酸配列を含む、(4) に記載の抗体またはその抗体断片。

(7) ヒト以外の動物の抗体が、ハイブリドーマ KM1468 (FERM BP-7978) により生産される (3) または (6) に記載の抗体またはその抗体断片。

- (8) ヒト型キメラ抗体のVHが配列番号2、および／またはVLが配列番号4で示されるアミノ酸配列を含む、(5)に記載の抗体またはその抗体断片。
- (9) ヒト型キメラ抗体が、KM1468 (FERM BP-7978) より生産される抗体のVHおよび／またはVLを含む、(5)または(8)に記載の抗体またはその抗体断片。
- (10) ヒト型キメラ抗体が、ヒト抗体の定常領域を含む、(5)、(8)および(9)のいずれか1項に記載の抗体またはその抗体断片。
- (11) ヒト抗体の定常領域が、ヒト抗体IgG1クラスおよび／または κ クラスの定常領域からなる(10)に記載の抗体またはその抗体断片。
- (12) ヒト型キメラ抗体が、形質転換株KM3002 (FERM BP-7996) により生産される(5)、(8)～(11)のいずれか1項に記載の抗体またはその抗体断片。
- (13) ヒト型CDR移植抗体のVHのCDR1、CDR2およびCDR3が、それぞれ配列番号5、6および7、および／またはVLのCDR1、CDR2およびCDR3が、それぞれ配列番号8、9および10で示されるアミノ酸配列を含む、(4)に記載の抗体またはその抗体断片。
- (14) ヒト型CDR移植抗体が、KM1468 (FERM BP-7978) により生産される抗体のVHのCDRおよび／またはKM1468 (FERM BP-7978) により生産される抗体のVLのCDRを含む、(5)または(13)に記載の抗体またはその抗体断片。
- (15) ヒト型CDR移植抗体が、ヒト抗体の定常領域を含む、(4)、(13)および(14)のいずれか1項に記載の抗体またはその抗体断片。
- (16) ヒト抗体の定常領域が、ヒト抗体IgG1クラスおよび／または κ クラスの定常領域からなる(15)に記載の抗体またはその抗体断片。
- (17) 抗体断片が、Fab、Fab'、F(ab')₂、一本鎖抗体(scFv)、二量体化V領域(Diabody)、ジスルフィド安定化V領域(dsFv) およびCDRを含むペプチドから選ばれる抗体断片である(1)～(16)のいずれか1項に記載の抗体断片。
- (18) (1)～(17)のいずれか1項に記載の抗体またはその抗体断片をコードするDNA。
- (19) (18)に記載のDNAを含有する組換えベクター。
- (20) (19)に記載の組換えベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換株。

(21) (20) に記載の形質転換株を培地に培養し、培養物中に請求の範囲 (1) ~ (16) のいずれか1項に記載の抗体またはその抗体断片を生成蓄積させ、培養物から抗体またはその抗体断片を採取することを特徴とする抗体またはその抗体断片の製造方法。

(22) (1) ~ (17) のいずれか1項に記載の抗体およびその抗体断片から選ばれる少なくとも1種を有効成分として含有する医薬。

(23) (1) ~ (17) のいずれか1項に記載の抗体およびその抗体断片から選ばれる少なくとも1種を有効成分として含有するヒトIGF介在性疾患または異常なヒトIGFの産生亢進により病態が進行する疾患の治療薬。

(24) (1) ~ (17) のいずれか1項に記載の抗体およびその抗体断片から選ばれる少なくとも1種を含有するヒトIGF介在性疾患または異常なヒトIGFの産生亢進により病態が進行する疾患の診断薬。

本発明の抗hIGF抗体は、ヒトIGF-IおよびヒトIGF-IIに特異的に結合し、ヒトIGF-IおよびヒトIGF-IIの機能を阻害する能力を有し、かつ、バイオセンサーピアコアで測定される結合定数が $5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 以上の結合活性を有する抗体があげられるが、そのなかでもhIGF-Iに対する結合活性およびhIGF-IIに対する結合活性が同程度である抗体であって、hIGF-IおよびhIGF-IIの機能を阻害する抗体が好ましい。

hIGF-I に対する結合活性および hIGF-II に対する結合活性が同程度とは、抗体が、hIGF-I および hIGF-II に同等に結合できることをいう。同等に結合できるとは、hIGF-I あるいは hIGF-II に対する抗体の結合活性を数値化し、その相対値で比較することができる。同等の結合活性とは、抗体の hIGF-I に対する結合活性を 1 としたとき、hIGF-II に対する結合活性が 0.1~10、好ましくは 0.2~5、さらに好ましくは 0.5~2、最も好ましくは 1 であるものがあげられる。結合活性の指標としては、表面プラズモン共鳴の原理などを利用したバイオセンサー法（以下、バイオセンサーピアコアと表記する）などで測定される結合定数（以下、 K_A とも表記する）などがあげられる。

本発明の抗体としては、天然型の hIGF-I および hIGF-II に存在するエпитープを認識する抗体、天然型の hIGF-I および hIGF-II の立体構造を認識する抗体などがあげられる。また、ヒト以外の他の生物種の IGF と交差反応性を示してもよい。

hIGF-I および hIGF-II の機能としては、乳房、前立腺、肺、結腸などの上皮系細胞の増殖、分化またはアポトーシスの制御など hIGF-I および hIGF-II が関与している機能であればいかなるものでもよい。

本発明の抗 hIGF 抗体としては、ヒト以外の動物の抗体および遺伝子組換え抗体ならびにそれらの抗体断片などがあげられる。

ヒト以外の動物の抗体としては、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体があげられるが、好ましくはモノクローナル抗体があげられる。

本発明のヒト以外の動物のモノクローナル抗体は、hIGF をヒト以外の動物に免疫し、免疫された動物の抗体産生細胞とミエローマ細胞とでハイブリドーマを作製し、次いで単一細胞化したハイブリドーマを選択し、これを培養し、培養上清から精製し、得ることができる。ヒト以外の動物としては、マウス、ラット、ハムスター、ウサギなど、ハイブリドーマを作製することが可能であれば、いかなるものも利用することができる。

本発明の抗体としては、好ましくは VH の CDR1、CDR2 および CDR3 が、それぞれ配列番号 5、6、および 7、および／または VL の CDR1、CDR2 および CDR3 が、それぞれ配列番号 8、9 および 10 で示されるアミノ酸配列を含む抗体があげられる。

本発明のヒト以外の動物由来のモノクローナル抗体の具体例としては、ハイブリドーマ KM1468(FERM BP-7978)が生産するラット抗体 KM1468 があげられる。

本発明の遺伝子組換え抗体としては、ヒト化抗体およびヒト抗体などがあげられる。

ヒト化抗体としては、ヒト型キメラ抗体、ヒト型 CDR 移植抗体などがあげられる。

ヒト型キメラ抗体は、ヒト以外の動物の抗体の VH および VL とヒト抗体の CH および CL とからなる抗体をいう。

本発明のヒト型キメラ抗体は、ヒト IGF-I およびヒト IGF-II に特異的に結合し、ヒト IGF-I およびヒト IGF-II の機能を阻害する能力を有し、かつ、バイオセンサ

ーピアコアで測定される結合定数が $5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 以上の結合活性を有するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマより、VH および VL をコードする cDNA を取得し、ヒト抗体の CH および CL をコードする遺伝子を有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築し、動物細胞へ導入することにより発現させ、製造することができる。

ヒト型キメラ抗体の CH としては、ヒトイムノグロブリン（以下、hIg と表記する）に属すればいかなるものでもよいが、hIgG クラスのものが好適であり、さらに hIgG クラスに属する hIgG1、hIgG2、hIgG3、hIgG4 といったサブクラスのいずれも用いることができる。また、ヒト型キメラ抗体の CL としては、hIg に属すればいずれのものでもよく、 κ クラスあるいは λ クラスのものを用いることができる。

本発明の hIGF-I および hIGF-II に結合するヒト型キメラ抗体（以下、抗 hIGF キメラ抗体と表記する）としては、配列番号 5、6、7 で示されるアミノ酸配列からなる VH の CDR1、CDR2、CDR3、および／または配列番号 8、9、10 で示されるアミノ酸配列からなる VL の CDR1、CDR2、CDR3、を含む抗 hIGF キメラ抗体、ハイブリドーマ KM1468 から生産されるモノクローナル抗体の VH および／または VL を含む抗 hIGF キメラ抗体、抗体の VH が配列番号 2 で示されるアミノ酸配列の 1～118 番目、および／または VL が配列番号 4 で示されるアミノ酸配列の 1～107 番目を含む抗 hIGF キメラ抗体、抗体の VH が配列番号 2 で示されるアミノ酸配列、ヒト抗体の CH が hIgG1 サブクラスのアミノ酸配列からなり、抗体の VL が配列番号 4 で示されるアミノ酸配列、ヒト抗体の CL が κ クラスのアミノ酸配列からなる抗 hIGF キメラ抗体、具体的には形質転換株 KM3002 (FERM BP-7996) が生産する抗 hIGF キメラ抗体 KM3002 があげられる。これらのアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、付加、置換または挿入され、かつ、ヒト IGF-I およびヒト IGF-II に特異的に結合し、ヒト IGF-I およびヒト IGF-II の機能を阻害する能力を有し、かつ、バイオセンサーピアコアで測定される結合定数が $5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 以上の結合活性を有する抗体も本発明の抗体に包含される。

ヒト型 CDR 移植抗体は、ヒト以外の動物の抗体の VH および VL の CDR のアミノ酸配列をヒト抗体の VH および VL の適切な位置に移植した抗体をいう。

本発明のヒト型 CDR 移植抗体は、ヒト IGF-I およびヒト IGF-II に特異的に結合し、ヒト IGF-I およびヒト IGF-II の機能を阻害する能力を有し、かつ、バイオセンサーピアコアで測定される結合定数が $5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 以上の結合活性を有するヒト以外の動物の抗体の VH および VL の CDR のアミノ酸配列を任意のヒト抗体の VH および VL の FR に移植した V 領域をコードする cDNA を構築し、ヒト抗体の CH および CL をコードする遺伝子を有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型 CDR 移植抗体発現ベクターを構築し、動物細胞へ導入することにより発現させ、製造することができる。

ヒト型 CDR 移植抗体の CH としては、hIg に属すればいかなるものでもよいが、hIgG クラスのものが好適であり、さらに hIgG クラスに属する hIgG1、hIgG2、hIgG3、hIgG4 といったサブクラスのいずれも用いることができる。また、ヒト型 CDR 移植抗体の CL としては、hIg に属すればいずれのものでもよく、 κ クラスあるいは λ クラスのものをを用いることができる。

本発明の hIGF-I および hIGF-II に結合するヒト型 CDR 移植抗体（以下、抗 hIGF CDR 移植抗体と表記する）としては、配列番号 5、6、7 で示されるアミノ酸配列からなる VH の CDR1、CDR2、CDR3、および／または配列番号 8、9、10 で示されるアミノ酸配列からなる VL の CDR1、CDR2、CDR3、を含む抗 hIGF CDR 移植抗体、ハイブリドーマ KM1468 から生産されるモノクローナル抗体の VH の CDR および／または VL の CDR を含む抗 hIGF CDR 移植抗体、抗体の VH が配列番号 15 で示されるアミノ酸配列の 1～118 番目、および／または VL が配列番号 16 で示されるアミノ酸配列の 1～107 番目を含む抗 hIGF CDR 移植抗体、抗体の VH が配列番号 15 で示されるアミノ酸配列、ヒト抗体の CH が hIgG1 サブクラスのアミノ酸配列からなり、抗体の VL が配列番号 16 で示されるアミノ酸配列、ヒト抗体の CL が κ クラスのアミノ酸配列からなる抗 hIGF CDR 移植抗体があげられる。これらのアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、付加、置換または挿入され、かつ、ヒト IGF-I およびヒト IGF-II に特異的に結合し、ヒト IGF-I およびヒト IGF-II の機能を阻害する能力を有し、かつ、バイオセンサーピアコアで測定される結合定数が $5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 以上の結合活性を有する抗体も本発明の抗体に包含される。

ヒト抗体は、元来、ヒト体内に天然に存在する抗体をいうが、最近の遺伝子工学的、細胞工学的、発生工学的な技術の進歩により作製されたヒト抗体ファージライブラリーおよびヒト抗体産生トランスジェニック動物から得られる抗体なども含まれる。

ヒト体内に存在する抗体は、例えば、ヒト末梢血リンパ球を単離し、EB ウイルスなどを感染させ不死化し、クローニングすることにより、該抗体を産生するリンパ球を培養でき、培養上清中より該抗体を精製することができる。

ヒト抗体ファージライブラリーは、ヒト B 細胞から調製した抗体遺伝子をファージ遺伝子に挿入することにより Fab、scFv などの抗体断片をファージ表面に発現させたライブラリーである。該ライブラリーより、抗原を固定化した基質に対する結合活性を指標として所望の抗原結合活性を有する抗体断片を表面に発現しているファージを回収することができる。該抗体断片は、さらに、遺伝子工学的手法により 2 本の完全な H 鎖および 2 本の完全な L 鎖からなるヒト抗体分子へも変換することができる。

ヒト抗体産生トランスジェニック動物は、ヒト抗体遺伝子が細胞内に組込まれた動物を意味する。具体的には、例えば、マウス ES 細胞へヒト抗体遺伝子を導入し、該 ES 細胞をマウスの初期胚へ移植後、発生させることによりヒト抗体産生トランスジェニックマウスを作製することができる。ヒト抗体産生トランスジェニック動物からのヒト抗体の作製方法は、通常のヒト以外の動物で行われているハイブリドーマ作製方法によりヒト抗体産生ハイブリドーマを取得し、培養することで培養上清中にヒト抗体を産生蓄積させることができる。

本発明の抗体断片としては、Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、diabody、dsFv および CDR を含むペプチドなどがあげられる。

Fab は、IgG を蛋白質分解酵素パバインで処理して得られる断片のうち (H 鎖の 224 番目のアミノ酸残基で切断される)、H 鎖の N 末端側約半分と L 鎖全体がジスルフィド結合で結合した分子量約 5 万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

本発明の Fab は、hIGF-I および hIGF-II に結合する抗体を蛋白質分解酵素パバインで処理して得ることができる。または、該抗体の Fab をコードする DNA を原核

生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、Fabを製造することができる。

$F(ab')_2$ は、IgGを蛋白質分解酵素ペプシンで処理して得られる断片のうち（H鎖の234番目のアミノ酸残基で切断される）、Fabがヒンジ領域のジスルフィド結合を介して結合されたものよりやや大きい、分子量約10万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

本発明の $F(ab')_2$ は、本発明のhIGF-IおよびhIGF-IIに結合する抗体を蛋白質分解酵素ペプシンで処理して得ることができる。または、下記のFab'をチオエーテル結合あるいはジスルフィド結合させ、作製することができる。

Fab'は、上記 $F(ab')_2$ のヒンジ領域のジスルフィド結合を切断した分子量約5万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

本発明のFab'は、本発明のhIGF-IおよびhIGF-IIに結合する $F(ab')_2$ を還元剤ジチオスレイトール処理して得ることができる。または、該抗体のFab'断片をコードするDNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、Fab'を製造することができる。

scFvは、1本のVHと1本のVLとを適当なペプチドリinker（以下、Pと表記する）を用いて連結した、VH-P-VLないしはVL-P-VHポリペプチドで、抗原結合活性を有する抗体断片である。

本発明のscFvは、本発明のhIGF-IおよびhIGF-IIに結合する抗体のVHおよびVLをコードするcDNAを取得し、scFvをコードするDNAを構築し、該DNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、scFvを製造することができる。

diabodyは、scFvが二量体化した抗体断片で、二価の抗原結合活性を有する抗体断片である。二価の抗原結合活性は、同一であることもできるし、一方を異なる抗原結合活性とすることもできる。

本発明の diabody は、本発明の hIGF-I および hIGF-II に結合する抗体の VH および VL をコードする cDNA を取得し、scFv をコードする DNA を P のアミノ酸配列の長さが 8 残基以下となるように構築し、該 DNA を原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、diabody を製造することができる。

dsFv は、VH および VL 中のそれぞれ 1 アミノ酸残基をシステイン残基に置換したポリペプチドを該システイン残基間のジスルフィド結合を介して結合させたものをいう。システイン残基に置換するアミノ酸残基は Reiter らにより示された方法 (Protein Engineering, 7, 697-704, 1994) に従って、抗体の立体構造予測に基づいて選択することができる。

本発明の dsFv は、本発明の hIGF-I および hIGF-II に結合する抗体の VH および VL をコードする cDNA を取得し、dsFv をコードする DNA を構築し、該 DNA を原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、dsFv を製造することができる。

CDR を含むペプチドは、VH または VL の CDR の少なくとも 1 領域以上を含んで構成される。複数の CDR を含むペプチドは、直接または適当なペプチドリンカーを介して結合させることができる。

本発明の CDR を含むペプチドは、本発明の hIGF-I および hIGF-II に結合する抗体の VH および VL の CDR をコードする DNA を構築し、該 DNA を原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、CDR を含むペプチドを製造することができる。

また、CDR を含むペプチドは、Fmoc 法 (フルオレニルメチルオキシカルボニル法)、tBoc 法 (t-ブチルオキシカルボニル法) などの化学合成法によって製造することもできる。

本発明の抗体は、本発明の hIGF-I および hIGF-II に結合する抗体および抗体断片に放射性同位元素、低分子の薬剤、高分子の薬剤、蛋白質などを化学的あるいは遺伝子工学的に結合させた抗体の誘導体を包含する。

本発明の抗体の誘導体は、本発明の hIGF-I および hIGF-II に結合する抗体および抗体断片の H 鎖あるいは L 鎖の N 末端側あるいは C 末端側、抗体および抗体断片中の適当な置換基あるいは側鎖、さらには抗体および抗体断片中の糖鎖などに放射性同位元素、低分子の薬剤、高分子の薬剤、蛋白質などを化学的手法（抗体工学入門、金光修著、地人書館、1994）により結合させることにより製造することができる。

また、本発明の hIGF-I および hIGF-II に結合する抗体および抗体断片をコードする DNA と、結合させたい蛋白質をコードする DNA を連結させて発現用ベクターに挿入し、該発現ベクターを適当な宿主細胞へ導入し、発現させることにより製造することができる。

放射性同位元素としては、 ^{131}I 、 ^{125}I などがあげられ、例えば、クロラミン T 法などにより抗体に結合させることができる。

低分子の薬剤としては、ナイトロジェン・マスタード、サイクロフォスファミドなどのアルキル化剤、5-フルオロウラシル、メソトレキセートなどの代謝拮抗剤、ダウノマイシン、ブレオマイシン、マイトマイシン C、ダウノルビシン、ドキソルビシンなどの抗生物質、ビンクリスチン、ビンブラスチン、ビンデシンのような植物アルカロイド、タモキシフェン、デキサメタソンなどのホルモン剤などの抗癌剤（臨床腫瘍学、日本臨床腫瘍研究会編、癌と化学療法社、1996）、またはヒドロコルチゾン、プレドニゾンなどのステロイド剤、アスピリン、インドメタシンなどの非ステロイド剤、金チオマレート、ペニシラミンなどの免疫調節剤、サイクロフォスファミド、アザチオプリンなどの免疫抑制剤、マレイン酸クロルフェニラミン、クレマシチンのような抗ヒスタミン剤などの抗炎症剤（炎症と抗炎症療法、医歯薬出版株式会社、1982）などがあげられる。例えば、ダウノマイシンと抗体を結合させる方法としては、グルタルアルデヒドを介してダウノマイシンと抗体のアミノ

基間を結合させる方法、水溶性カルボジイミドを介してダウノマイシンのアミノ基と抗体のカルボキシル基を結合させる方法などがあげられる。

高分子の薬剤としては、ポリエチレングリコール（以下、PEG と表記する）、アルブミン、デキストラン、ポリオキシエチレン、スチレンマレイン酸コポリマー、ポリビニルピロリドン、ビランコポリマー、ヒドロキシプロピルメタクリルアミドなどがあげられる。これらの高分子化合物を抗体および抗体断片に結合させることにより、（1）化学的、物理的あるいは生物的な種々の因子に対する安定性の向上、（2）血中半減期の顕著な延長、（3）免疫原性の消失、抗体産生の抑制、などの効果が期待される（バイオコンジュゲート医薬品、廣川書店、1993）。例えば、PEG と抗体を結合させる方法としては、PEG 化修飾試薬と反応させる方法などがあげられる（バイオコンジュゲート医薬品、廣川書店、1993）。PEG 化修飾試薬としては、リジンの ϵ -アミノ基の修飾剤（特昭 61-178926）、アスパラギン酸およびグルタミン酸のカルボキシル基の修飾剤（特昭 56-23587）、アルギニンのグアニジノ基の修飾剤（特平 2-117920）などがあげられる。

蛋白質としては、免疫担当細胞を活性化するサイトカイン、例えば、ヒトインターロイキン 2（以下、hIL-2 と表記する）、ヒト顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（以下、hGM-CSF と表記する）、ヒトマクロファージコロニー刺激因子（以下、hM-CSF と表記する）、ヒトインターロイキン 12（以下、hIL-12 と表記する）などがあげられる。また、癌細胞を直接障害する活性を有するリシンやジフテリア毒素などの毒素を用いることができる。例えば、蛋白質との融合抗体については、抗体および抗体断片をコードする cDNA に蛋白質をコードする cDNA を連結させ、融合抗体をコードする DNA を構築し、該 DNA を原核生物あるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、融合抗体を製造することができる。

本発明の hIGF-I および hIGF-II に対する抗体および抗体断片は、ELISA (Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14, 1988; Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press Limited, 1996)、バイオセンサーピアコアで測定される K_A (Journal of

Immunological Methods, 145, 229-240, 1991)、および hIGF-I および hIGF-II による細胞増殖に対する阻害活性 (Cancer Research, 48, 4083-4092, 1988) などを測定することにより、hIGF-I および hIGF-II に対する結合活性、hIGF-I および hIGF-II の機能を阻害する活性を評価することができる。

本発明の hIGF が介在する疾患または異常な hIGF の産生亢進により病態が進行する疾患としては、軽度・重度に関わらず、hIGF による異常な細胞増殖により病態が進行する疾患であればいかなる疾患も包含し、具体的には癌、糖尿病性合併症、リウマチ性関節炎などがあげられる。

以下に、ヒト IGF-I およびヒト IGF-II に特異的に結合し、ヒト IGF-I およびヒト IGF-II の機能を阻害する能力を有し、かつ、バイオセンサービオコアで測定される結合定数が $5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 以上の結合活性を有する抗体またはその抗体断片の作製方法および活性評価について記す。

1. hIGF に対するヒト以外の動物のモノクローナル抗体の作製

(1) 抗原の調製

hIGF をコードする cDNA を含む発現ベクターを大腸菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などに導入、発現させ、組換え型 hIGF 蛋白質を得る。あるいは、hIGF 部分配列を有する合成ペプチドを抗原に用いることもできる。

抗原用部分ペプチドとしては、5~30 残基程度の蛋白質部分配列が選択される。変性していない天然の構造を有している状態の該蛋白質を認識する抗体を取得するためには、立体構造上蛋白質の表面に存在している部分配列を抗原ペプチドとして選択する必要がある。立体構造上蛋白質表面に存在する部分は、Genetyx Mac など市販の蛋白質配列解析ソフトを用い、親水性の高い部分配列を予測することで推測することができる。すなわち、一般的に親水性の低い部分は立体構造上蛋白質の内部に存在する場合が多く、親水性の高い部分は蛋白質表面に存在する場合が多いためである。また、蛋白質の N 末端、C 末端は蛋白質表面に存在する場合が多い。しかしながら、このように選択した部分ペプチドが目的通りの抗体を確立する抗原となるとは限らない。

部分ペプチドには蛋白質と架橋するために、システインを末端に付加する。蛋白質の内部配列を選択した場合には、必要に応じペプチドのN末端はアセチル化、C末端はアミド化する。

部分ペプチドは一般的な液相、固相ペプチド合成法およびそれらを適宜組み合わせる方法、またはそれらに準じる方法によって合成することができる (The Peptides, Analysis, Synthesis, Biology, Vol. 1, 1979; Vol. 2, 1980; Vol. 3, 1981, Academic Press; ペプチド合成の基礎と実験、丸善、1985; 続医薬品の開発、第14巻、ペプチド合成、廣川書店、1991; International Journal of Peptide & Protein Research, 35, 161-214, 1990)。

また、自動ペプチド合成機を用いることもできる。ペプチド合成機によるペプチドの合成は、島津製作所製ペプチド合成機、Applied Biosystems, Inc.社 (以下、ABI社と表記する) 製ペプチド合成機、Advanced ChemTech Inc.社 (以下、ACT社と表記する) 製ペプチド合成機などの市販のペプチド合成機上で、適当に側鎖を保護した $N\alpha$ -Fmoc-アミノ酸あるいは $N\alpha$ -Boc-アミノ酸などを用い、それぞれの合成プログラムに従って実施することができる。

原料となる保護アミノ酸および担体樹脂は、ABI社、島津製作所、国産化学(株)、Nova Biochem社、渡辺化学(株)、ACT社またはペプチド研究所(株)などから入手することができる。また、原料となる保護アミノ酸、保護有機酸、保護有機アミンは報告されている合成法に従って、あるいはそれに準じて合成することができる (The Peptides, Analysis, Synthesis, Biology, Vol. 1, 1979; Vol. 2, 1980; Vol. 3, 1981, Academic Press; ペプチド合成の基礎と実験、丸善、1985; 続医薬品の開発、第14巻、ペプチド合成、廣川書店、1991; International Journal of Peptide & Protein Research, 35, 161-214, 1990)。

(2) 動物の免疫と抗体産生細胞の調製

免疫に用いる動物としては、マウス、ラット、ハムスター、ラビットなどハイブリドーマを作製することが可能であれば、いかなるものでもよい。下記に、マウスおよびラットを用いる例を説明する。

3～20 週令のマウスまたはラットに、上記 1 (1) で調製した抗原を免疫し、その動物の脾臓、リンパ節、末梢血より抗体産生細胞を採取する。免疫は、動物の皮下、静脈内または腹腔内に適当なアジュバントとともに抗原を数回投与することにより行う。アジュバントとしては、フロインドの完全アジュバント (Complete Freund's Adjuvant) または、水酸化アルミニウムゲルと百日咳菌ワクチンなどがあげられる。また、ウシ血清アルブミン (以下、BSA と表記する) や Keyhole Limpet Hemocyanin (以下、KLH と表記する) などのキャリア蛋白質とコンジュゲートを作製し、これを免疫原として用いることができる。各抗原の投与後 3 ～7 日目に免疫動物の眼底静脈叢あるいは尾静脈より採血し、抗原として用いた hIGF に対する反応性を ELISA などで確認し、その血清が十分な抗体価を示したマウスまたはラットを抗体産生細胞の供給源とする。抗原の最終投与後 3 ～7 日目に、免疫したマウスまたはラットより公知の方法 (Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988) に準じて脾臓などを摘出し、抗体産生細胞と骨髓腫細胞とを融合させる。

(3) 骨髓腫細胞の調製

骨髓腫細胞としては、マウスから得られた株化細胞である 8-アザグアニン耐性骨髓腫細胞株 P3-X63Ag8-U1 (P3-U1) (European Journal of Immunology, 6, 511-519, 1976)、SP2/0-Ag14 (SP-2) (Nature, 276, 269-270, 1978)、P3-X63-Ag8653 (653) (Journal of Immunology, 123, 1548-1550, 1979)、P3-X63-Ag8 (X63) (Nature, 256, 495-497, 1975) など、in vitro で増殖可能な骨髓腫細胞であればいかなるものでもよい。これらの細胞株の培養および継代については公知の方法 (Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988) に従い、細胞融合時まで 2×10^7 個以上の細胞数を確保する。

(4) 細胞融合

上記で得られた抗体産生細胞と骨髓腫細胞とを洗浄したのち、ポリエチレングリコール-1000 (以下、PEG-1000 と表記する) などの細胞凝集性媒体を加え、細胞を融合させ、培地中に懸濁する。細胞の洗浄には Modified Eagle's Medium (以下、MEM と表記する) または Phosphate Buffered Saline (以下、PBS と表記する) な

どを用いる。また、融合細胞を懸濁する培地としては、目的の融合細胞のみを選択的に得られるように、HAT 培地 {通常培地 [RPMI-1640 培地に 1.5mM グルタミン、50 μ M 2-メルカプトエタノール、10 μ g/mL ジェンタマイシンおよび 10% 牛胎児血清 (以下、FCS と表記する) を加えた培地] に 0.1mM ヒポキサンチン、15 μ M チミジンおよび 0.4 μ M アミノプテリンを加えた培地} を用いる。

培養後、培養上清の一部を取り、ELISA により抗原蛋白質に反応し、非抗原蛋白質に反応しないサンプルを選択する。次いで、限界希釈法により単一細胞化を行い、ELISA により安定して高い抗体価の認められたものをモノクローナル抗体産生ハイブリドーマとして選択する。

(5) ハイブリドーマの選択

抗 hIGF モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの選択は、公知の方法 (Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988) に従い、以下に述べる ELISA により行う。これらの方法により、後述する抗 hIGF キメラ抗体、抗 hIGF CDR 移植抗体またはそれらの抗体断片を産生する形質転換株の培養上清中に含まれる抗体あるいはすべての精製抗体の結合活性を測定することができる。

ELISA

抗原を 96 穴 ELISA プレートに固定化し、ハイブリドーマなどの培養上清あるいは精製抗体を第一抗体として反応させる。

第一抗体反応後、プレートを洗浄して第二抗体を添加する。第二抗体としては、第一抗体を認識することができる抗体を、ビオチン、酵素、化学発光物質あるいは放射性同位元素などで標識した抗体を用いる。具体的にはハイブリドーマ作製の際にマウスを用いたのであれば、第二抗体としてはマウス抗体を認識できる抗体を、あるいはハイブリドーマ作製の際にラットを用いたのであれば、第二抗体としてはラット抗体を認識できる抗体を用いる。

反応後、第二抗体の標識物質に応じた反応を行ない、抗原に特異的に反応するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマとして選択する。

当該ハイブリドーマの具体例としては、ハイブリドーマ KM1468 などがあげられる。ハイブリドーマ KM1468 は、平成 14 年 3 月 26 日付けで独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6 郵便番号 305-8566）に FERM BP-7978 として寄託されている。

(6) モノクローナル抗体の精製

0.5mL のプリスタン（2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン）を腹腔内投与し、2 週間飼育した 8~10 週令のマウスまたはヌードマウスに、1 (4) で得られた抗 hIGF モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞 $5 \times 10^6 \sim 2 \times 10^7$ 細胞/匹を腹腔内に注射する。10~21 日間でハイブリドーマは腹水癌化する。該マウスまたはヌードマウスから腹水を採取し、遠心分離、40~50% 飽和硫酸アンモニウムによる塩析、カプリル酸沈殿法、DEAE- セファロースカラム、プロテイン A-カラムあるいはセルロファイン GSL2000（生化学工業社製）のカラムなどを用いて、IgG あるいは IgM 画分を回収し、精製モノクローナル抗体とする。

精製モノクローナル抗体のサブクラスの決定は、マウスモノクローナル抗体タイピングキットまたはラットモノクローナル抗体タイピングキットなどを用いて行うことができる。蛋白質濃度は、ローリー法あるいは 280nm での吸光度より算出することができる。

抗体のサブクラスとは、クラス内のアイソタイプのことであり、例えば、マウスでは、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、ヒトでは、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 があげられる。

(7) モノクローナル抗体の活性評価

培養上清中あるいは精製した抗 hIGF モノクローナル抗体の hIGF に対する結合活性は、上記 1 (5) の結合 ELISA、競合 ELISA、およびバイオセンサーピアコアなどにより測定することができる。

結合 ELISA とは、抗原を 96 ウェル ELISA プレートに固定化し、第一抗体として反応させ、第一抗体を認識することができる標識した二次抗体を反応させて、標識物を検出することにより、抗原と抗体との結合活性を測定する方法である。具体的には、固定化する抗原としては、hIGF-I や hIGF-II の精製蛋白質や部分配列を有

するペプチドがあげられる。第一抗体としては、ハイブリドーマなどの培養上清あるいは精製抗体などの測定対象物があげられる。第二抗体としては、第一抗体を認識することができる抗体を、ビオチン、酵素、化学発光物質あるいは放射性同位元素などで標識した抗体があげられる。具体的には、西洋ワサビペルオキシダーゼで標識された抗ラットイムノグロブリン（以下、rIg と表記する）マウス抗体などがあげられる。

競合 ELISA とは、あらかじめ hIGF-I あるいは hIGF-II を ELISA プレートに固定化し、測定対象物である抗体と、hIGF-I あるいは hIGF-II とを同時に添加して、反応させ、プレートに固定化した抗原と反応対象物である抗体の反応を、反応液中に添加したもう一種あるいは同一の抗原が阻害することを、プレートに結合する一次抗体の量の変化で測定する方法である。抗体の結合量の変化は抗体に対する二次抗体により検出する。また、天然型の hIGF および hIGF の部分ペプチドを用いた競合 ELISA により、天然型の hIGF との反応性および抗原エピトープを解析することができる。抗体が hIGF の立体構造を認識しているか否かは、通常行われる構造的解析法により調べることができる。構造的解析法としては、例えば、X 線結晶解析、核磁気共鳴法などがあげられる。

バイオセンサーピアコアによる測定とは、2 分子間の結合と解離に伴うセンサーチップ表面で生じる微量な質量変化を光学現象により、SPR シグナルとして検出するものである。本法での測定から導きだされた結合速度定数（以下、 K_{ass} と表記する）、解離速度定数（以下、 K_{diss} と表記する）から、 $K_A = K_{ass}/K_{diss}$ で計算される結合定数（以下、 K_A と表記する）が算出される。 K_A は、 M^{-1} の単位で表される。バイオセンサーピアコアでの測定は、添付の使用説明書に従って至適な測定条件下で行うことができる。至適な測定条件としては、センサーチップへ固定化するリガンドの量は、式 1 により算出される最小値と式 2 で算出される最大値の間の範囲であることが好ましい。また、アナライトの結合量は、式 3 で算出される最大結合量以下であることが好ましい。式 1、式 2 および式 3 において、リガンドとはセンサーチップに固定化する分子を示し、アナライトとは流路系を介して添加する分子を示し、 S とはリガンドの結合部位数を示す。RU とは、Resonance Unit の略であり、

センサーチップ表面での単位面積あたりの質量の変化量を示し、1 RU = 1 pg/mm²に相当する。バイオセンサーピアコアでの測定では、最大結合量が維持できるように流速および洗浄条件を設定することにより、蛋白質の結合様式に則った結合定数の解析を行うことができる。

式 1

最小固定化量(RU)=200×1/S× (リガンドの分子量/アナライトの分子量)

式 2

最大固定化量(RU)=1000×1/S× (リガンドの分子量/アナライトの分子量)

式 3

最大結合量=アナライトの分子量×リガンドの固定化量(RU)/リガンドの分子量×S

また、hIGF 依存的な増殖を示す細胞株の in vivo あるいは in vitro の増殖に対する抗体の影響を検討することにより、hIGF の機能を阻害する本発明の抗体の活性を測定することができる。

hIGF 依存的な増殖を示す細胞株の増殖に対する影響とは、hIGF 依存的な増殖を示す細胞株の hIGF 存在下での in vitro での細胞増殖、あるいはマウスなどの動物に移植した hIGF 依存的な増殖を示す細胞株の in vivo での細胞増殖に対する、本発明の抗体あるいは抗体断片の影響をいう。

hIGF 依存的な増殖を示す細胞株の hIGF 存在下での in vitro での細胞増殖としては、hIGF 非添加の基礎培地に hIGF を添加した培地で細胞を培養したときの細胞増殖などがあげられる。hIGF 非添加の基礎培地としては、TF/BSA 培地[D-MEM/F-12 (Gibco BRL 社製) に 10 μg/mL のヒトトランスフェリン (Gibco BRL 社製)、200 μg/mL の BSA を添加した培地]などがあげられる。細胞の増殖を測定する方法としては、細胞増殖試薬 WST-1 (Roche 社製) を使用して測定することができる。

hIGF 依存的な増殖を示す細胞株の in vivo での細胞増殖としては、マウスなどの動物に細胞を移植したときの動物体内での細胞の増殖などがあげられる。細胞の

増殖を測定する方法としては、例えば、腫瘍塊としてマウス体内に生着する場合には、腫瘍塊の体積を測定して細胞の増殖の指標とすることができる。

hIGF 依存的な増殖を示す細胞株としては、ヒト乳癌細胞株 MCF7 (ATCC HTB-22)、ヒト大腸癌細胞株 HT-29 (ATCC HTB-38)、ヒト骨肉腫細胞株 MG63 (ATCC CRL-1427) などがあげられる。また、hIGF-I 遺伝子を導入した形質転換株などがあげられる。

hIGF-I 遺伝子を導入した形質転換株としては、クローン化された hIGF-I 遺伝子が導入されて、hIGF-I 遺伝子非導入時と比べて hIGF-I の発現量が増大した細胞株があげられる。具体的には、ヒト肺癌細胞株 A549 細胞 (ATCC CCL-185) に hIGF-I 遺伝子を導入した形質転換体などがあげられる。hIGF-I 遺伝子は、文献

(Molecular Endocrinology, 4, 1914-1920, 1990) に記載の配列を PCR などの方法により、クローニングすることができる。

2. ヒト化抗体の作製

(1) ヒト化抗体発現用ベクターの構築

ヒト化抗体発現用ベクターとしては、ヒト抗体の CH および/または CL をコードする遺伝子が組み込まれた動物細胞用発現ベクターであればいかなるものでもよい。ヒト化抗体発現用ベクターは、動物細胞用発現ベクターにヒト抗体の CH および CL をコードする遺伝子をそれぞれクローニングすることにより構築することができる。

ヒト抗体の C 領域は任意のヒト抗体の CH および CL であることができ、例えば、ヒト抗体の H 鎖の IgG1 サブクラスの C 領域 (以下、hC γ 1 と表記する) およびヒト抗体の L 鎖の κ クラスの C 領域 (以下、hC κ と表記する) などがあげられる。ヒト抗体の CH および CL をコードする遺伝子としてはエキソンとイントロンからなる染色体 DNA を用いることができ、また、cDNA を用いることもできる。

動物細胞用発現ベクターとしては、ヒト抗体の C 領域をコードする遺伝子を組み込み発現できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、pAGE107 (Cytotechnology, 3, 133-140, 1990)、pAGE103 (Journal of Biochemistry, 101, 1307-1310, 1987)、pHSG274 (Gene, 27, 223-232, 1984)、pKCR (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States

of America, 78, 1527-1531, 1981)、pSG1 β d2-4 (Cytotechnology, 4, 173-180, 1990) などがあげられる。動物細胞用発現ベクターに用いるプロモーターとエンハンサーとしては、SV40 の初期プロモーターとエンハンサー (Journal of Biochemistry, 101, 1307-1310, 1987)、モロニーマウス白血病ウイルスの LTR プロモーターとエンハンサー (Biochemical & Biophysical Research Communications, 149, 960-968, 1987)、イムノグロブリン H 鎖のプロモーター (Cell, 41, 479-487, 1985) とエンハンサー (Cell, 33, 717-728, 1983) などがあげられる。

ヒト化抗体発現用ベクターは、抗体 H 鎖および L 鎖が別々のベクター上に存在するタイプあるいは同一のベクター上に存在するタイプ (以下、タンデム型と表記する) のどちらでも用いることができるが、ヒト化抗体発現ベクターの構築の容易さ、動物細胞への導入の容易さ、動物細胞内での抗体 H 鎖および L 鎖の発現量のバランスが均衡するなどの点からタンデム型のヒト化抗体発現用ベクターの方が好ましい (Journal of Immunological Methods, 167, 271-278, 1994)。タンデム型のヒト化抗体発現用ベクターとしては、pKANTEX93 (W097/10354)、pEE18 (Hybridoma, 17, 559-567, 1998) などがあげられる。

構築したヒト化抗体発現用ベクターは、ヒト型キメラ抗体およびヒト型 CDR 移植抗体の動物細胞での発現に使用できる。

(2) ヒト以外の動物の抗体の V 領域をコードする cDNA の取得およびアミノ酸配列の解析

ヒト以外の動物の抗体、例えば、マウス抗体の VH および VL をコードする cDNA は以下のようにして取得する。

マウス抗体などを産生するハイブリドーマより mRNA を抽出し、cDNA を合成する。合成した cDNA をファージあるいはプラスミドなどのベクターにクローニングして cDNA ライブラリーを作製する。該ライブラリーより、マウス抗体の C 領域部分あるいは V 領域部分をプローブとして用い、VH をコードする cDNA を有する組換えファージあるいは組換えプラスミドおよび VL をコードする cDNA を有する組換えファージあるいは組換えプラスミドをそれぞれ単離する。組換えファージあるいは組換

えプラスミド上の目的とするマウス抗体の VH および VL の全塩基配列を決定し、塩基配列より VH および VL の全アミノ酸配列を推定する。

ヒト以外の動物としては、マウス、ラット、ハムスター、ラビットなど、ハイブリドーマを作製することが可能であれば、いかなるものも用いることができる。

ハイブリドーマから全 RNA を調製する方法としては、チオシアン酸ゲアニジントリフルオロ酢酸セシウム法 (Methods in Enzymology, 154, 3-28, 1987)、また全 RNA から mRNA を調製する方法としては、オリゴ(dT)固定化セルロースカラム法 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab. Press New York, 1989) などがあげられる。また、ハイブリドーマから mRNA を調製するキットとしては、Fast Track mRNA Isolation Kit (Invitrogen 社製)、Quick Prep mRNA Purification Kit (Amersham Pharmacia 社製) などがあげられる。

cDNA の合成および cDNA ライブラリー作製法としては、常法 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab. Press New York, 1989; Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1-34)、あるいは市販のキット、例えば、Super Script™ Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning (GIBCO BRL 社製)、ZAP-cDNA Synthesis Kit (Stratagene 社製) や TimeSaver cDNA Synthesis Kit (Amersham-Pharmacia 社製) を用いる方法などがあげられる。

cDNA ライブラリーの作製の際、ハイブリドーマから抽出した mRNA を鋳型として合成した cDNA を組み込むベクターは、該 cDNA を組み込めるベクターであればいかなるものでも用いることができる。例えば、ZAP Express (Stratagene, 5, 58-61, 1992)、pBluescript II SK(+) (Nucleic Acids Research, 17, 9494, 1989)、 λ ZAP II (Stratagene 社製)、 λ gt10、 λ gt11 (DNA Cloning: A Practical Approach, I, 49, 1985)、Lambda BlueMid (Clontech 社製)、 λ ExCell、pT7T3 18U (Amersham-Pharmacia 社製)、pcD2 (Molecular & Cellular Biology, 3, 280-289, 1983) および pUC18 (Gene, 33, 103-119, 1985) などのファージあるいはプラスミドベクターが用いられる。

ファージあるいはプラスミドベクターにより構築される cDNA ライブラリーを導入する大腸菌としては該 cDNA ライブラリーを導入、発現および維持できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、XL1-Blue MRF' (Journal of Biotechnology, 23, 271-289, 1992)、C600 (Genetics, 59, 177-190, 1968)、Y1088、Y1090 (Science, 222, 778-782, 1983)、NM522 (Journal of Molecular Biology, 166, 1-19, 1983)、K802 (Journal of Molecular Biology, 16, 118-133, 1966) および JM105 (Gene, 38, 275-276, 1985) などが用いられる。

cDNA ライブラリーからのヒト以外の動物の抗体の VH および VL をコードする cDNA クローンの選択法としては、放射性同位元素あるいは蛍光標識、あるいは酵素標識したプローブを用いたコロニー・ハイブリダイゼーション法あるいはブラーク・ハイブリダイゼーション法 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab. Press New York, 1989) により選択することができる。また、プライマーを調製し、mRNA から合成した cDNA あるいは cDNA ライブラリーを鋳型として、Polymerase Chain Reaction (以下、PCR 法と表記する; Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab. Press New York, 1989; Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1-34) により VH および VL をコードする cDNA を調製することもできる。

上記方法により選択された cDNA を、適当な制限酵素等で切断後、pBluescript SK(-) (Stratagene 社製) などのプラスミドベクターにクローニングし、通常用いられる塩基配列解析方法、例えば、ジデオキシ法 (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 74, 5463-5467, 1977) などの反応を行い、塩基配列自動分析装置、例えば、塩基配列自動分析装置 ABI PRISM 377 (Applied Biosystems 社製) などを用いて解析することで該 cDNA の塩基配列を決定することができる。

決定した塩基配列から VH および VL の全アミノ酸配列を推定し、既知の抗体の VH および VL の全アミノ酸配列 (Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991) と比較することにより、取得した cDNA が分泌シグナル配列を含む抗体の VH および VL の完全なアミノ酸配

列をコードしているかを確認することができる。分泌シグナル配列を含む抗体の VH および VL の完全なアミノ酸配列に関しては、既知の抗体の VH および VL の全アミノ酸配列 (Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991) と比較することにより、分泌シグナル配列の長さおよび N 末端アミノ酸配列を推定でき、さらにはそれらが属するサブグループを知ることができる。また、VH および VL の各 CDR のアミノ酸配列についても、既知の抗体の VH および VL のアミノ酸配列 (Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991) と比較することによって見出すことができる。

さらに、VH および VL の完全なアミノ酸配列を用いて任意のデータベース、例えば、SWISS-PROT や PIR-Protein などに対して BLAST 法 (Journal of Molecular Biology, 215, 403-410, 1990) などの配列の相同性検索を行い、配列の新規性を検討することができる。

(3) ヒト型キメラ抗体発現ベクターの構築

上記 2 (1) に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体の CH および CL をコードする遺伝子上流に、ヒト以外の動物の抗体の VH および VL をコードする cDNA をクローニングし、ヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築することができる。例えば、ヒト以外の動物の抗体の VH および VL をコードする cDNA を、ヒト以外の動物の抗体の VH および VL の 3' 末端側の塩基配列とヒト抗体の CH および CL の 5' 末端側の塩基配列とから成り、かつ適当な制限酵素の認識配列を両端に有する合成 DNA とそれぞれ連結し、それぞれを上記 2 (1) に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体の CH および CL をコードする遺伝子上流にそれらが適切な形で発現するようにクローニングし、ヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築することができる。また、ヒト以外の動物の抗体の VH および VL をコードする cDNA を含むプラスミドを鋳型として、5' 末端に適当な制限酵素の認識配列を有するプライマーを用いて PCR 法により VH および VL をコードする cDNA を増幅し、それぞれを上記 2 (1) に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体の CH および CL をコードする遺伝子の

上流にそれらが適切な形で発現するようにクローニングし、ヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築することができる。

(4) ヒト型 CDR 移植抗体の V 領域をコードする cDNA の構築

ヒト型 CDR 移植抗体の VH および VL をコードする cDNA は、以下のようにして構築することができる。まず、目的のヒト以外の動物の抗体の VH および VL の CDR のアミノ酸配列を移植するヒト抗体の VH および VL の FR のアミノ酸配列を選択する。ヒト抗体の VH および VL の FR のアミノ酸配列としては、ヒト抗体由来のものであれば、いかなるものでも用いることができる。例えば、Protein Data Bank などのデータベースに登録されているヒト抗体の VH および VL の FR のアミノ酸配列、ヒト抗体の VH および VL の FR の各サブグループの共通アミノ酸配列 (Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991) などがあげられるが、その中でも、十分な活性を有するヒト型 CDR 移植抗体を作製するためには、目的のヒト以外の動物の抗体の VH および VL の FR のアミノ酸配列とできるだけ高い相同性（少なくとも 60%以上）を有するアミノ酸配列を選択することが望ましい。次に、選択したヒト抗体の VH および VL の FR のアミノ酸配列に目的のヒト以外の動物の抗体の VH および VL の CDR のアミノ酸配列を移植し、ヒト型 CDR 移植抗体の VH および VL のアミノ酸配列を設計する。設計したアミノ酸配列を抗体の遺伝子の塩基配列に見られるコドンの使用頻度 (Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991) を考慮して塩基配列に変換し、ヒト型 CDR 移植抗体の VH および VL のアミノ酸配列をコードする塩基配列を設計する。設計した塩基配列に基づき、100 塩基前後の長さからなる数本の合成 DNA を合成し、それらを用いて PCR 法を行う。この場合、PCR での反応効率および合成可能な DNA の長さから、VH、VL とも 6 本の合成 DNA を設計することが好ましい。

また、両端に位置する合成 DNA の 5' 末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、上記 2 (1) で構築したヒト化抗体発現用ベクターに容易にクローニングすることができる。PCR 反応後、増幅産物を pBluescript SK(-) (Stratagene 社製) などのプラスミドにクローニングし、上記 2 (2) に記載の方法により、塩基

配列を決定し、所望のヒト型 CDR 移植抗体の VH および VL のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するプラスミドを取得する。

(5) ヒト型 CDR 移植抗体の V 領域のアミノ酸配列の改変

ヒト型 CDR 移植抗体は、目的のヒト以外の動物の抗体の VH および VL の CDR のみをヒト抗体の VH および VL の FR に移植しただけでは、その抗原結合活性は元のヒト以外の動物の抗体に比べて低下してしまうことが知られている (BIO/TECHNOLOGY, 9, 266-271, 1991)。この原因としては、元のヒト以外の動物の抗体の VH および VL では、CDR のみならず、FR のいくつかのアミノ酸残基が直接的あるいは間接的に抗原結合活性に関与しており、それらアミノ酸残基が CDR の移植に伴い、ヒト抗体の VH および VL の FR の異なるアミノ酸残基へと変化してしまうことが考えられている。この問題を解決するため、ヒト型 CDR 移植抗体では、ヒト抗体の VH および VL の FR のアミノ酸配列の中で、直接抗原との結合に関与しているアミノ酸残基や CDR のアミノ酸残基と相互作用したり、抗体の立体構造を維持し、間接的に抗原との結合に関与しているアミノ酸残基を同定し、それらを元のヒト以外の動物の抗体に見出されるアミノ酸残基に改変し、低下した抗原結合活性を上昇させることが行われている (BIO/TECHNOLOGY, 9, 266-271, 1991)。ヒト型 CDR 移植抗体の作製においては、それら抗原結合活性に関わる FR のアミノ酸残基を如何に効率よく同定するかが、最も重要な点であり、そのために X 線結晶解析 (Journal of Molecular Biology, 112, 535-542, 1977) あるいはコンピューターモデリング (Protein Engineering, 7, 1501-1507, 1994) などによる抗体の立体構造の構築および解析が行われている。これら抗体の立体構造の情報は、ヒト型 CDR 移植抗体の作製に多くの有益な情報をもたらして来たが、その一方、あらゆる抗体に適応可能なヒト型 CDR 移植抗体の作製法は未だ確立されておらず、現状ではそれぞれの抗体について数種の改変体を作製し、それぞれの抗原結合活性との相関を検討するなどの種々の試行錯誤が必要である。

ヒト抗体の VH および VL の FR のアミノ酸残基の改変は、改変用合成 DNA を用いて上記 2 (4) に記載の PCR 法を行うことにより、達成できる。PCR 後の増幅産物に

ついて上記 2 (2) に記載の方法により、塩基配列を決定し、目的の改変が施されたことを確認する。

(6) ヒト型 CDR 移植抗体発現ベクターの構築

上記 2 (1) に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体の CH および CL をコードする遺伝子上流に、上記 2 (4) および (5) で構築したヒト型 CDR 移植抗体の VH および VL をコードする cDNA をクローニングし、ヒト型 CDR 移植抗体発現ベクターを構築することができる。

例えば、上記 2 (4) および (5) でヒト型 CDR 移植抗体の VH および VL を構築する際に用いる合成 DNA のうち、両端に位置する合成 DNA の 5' 末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、上記 2 (1) に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体の CH および CL をコードする遺伝子上流にそれらが適切な形で発現するようにクローニングすることができる。

(7) ヒト化抗体の一過性発現

作製した多種類のヒト化抗体の抗原結合活性を効率的に評価するために、上記 2 (3) および (6) に記載のヒト化抗体発現ベクター、あるいはそれらを改変した発現ベクターを用いてヒト化抗体の一過性発現を行うことができる。発現ベクターを導入する宿主細胞としては、ヒト化抗体を発現できる宿主細胞であれば、いかなる細胞でも用いることができるが、その発現量の高さから、サル腎臓由来細胞株 COS-7 細胞 (ATCC CRL1651) が一般に用いられる (Methods in Nucleic Acids Research, CRC press, 283, 1991)。COS-7 細胞への発現ベクターの導入法としては、DEAE-デキストラン法 (Methods in Nucleic Acids Research, CRC press, 283, 1991)、リポフェクション法 (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 84, 7413-7417, 1987

発現ベクターの導入後、培養上清中のヒト化抗体の発現量及び抗原結合活性は ELISA (Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14, 1988; Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press Limited, 1996) などにより測定できる。

(8) ヒト化抗体の安定発現

上記2 (3) および (6) に記載のヒト化抗体発現ベクターを適当な宿主細胞に導入することによりヒト化抗体を安定に発現する形質転換細胞を得ることができる。

宿主細胞への発現ベクターの導入法としては、エレクトロポレーション法 (Cytotechnology, 3, 133-140, 1990) などがあげられる。

ヒト化抗体発現ベクターを導入する宿主細胞としては、ヒト化抗体を発現させることができる宿主細胞であれば、いかなる細胞でも用いることができる。例えば、マウス SP2/0-Ag14 細胞 (ATCC CRL1581)、マウス P3X63-Ag8.653 細胞 (ATCC CRL1580)、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子 (以下、dhfr と表記する) が欠損した CHO 細胞 (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 77, 4216-4220, 1980)、ラット YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 細胞 (ATCC CRL1662、以下、YB2/0 細胞と表記する) などがあげられる。

発現ベクターの導入後、ヒト化抗体を安定に発現する形質転換体は、特開平 2-257891 に開示されている方法に従い、G418 sulfate (以下、G418 と表記する) などの薬剤を含む動物細胞培養用培地で培養することにより選択できる。動物細胞培養用培地としては、RPMI1640 培地 (日水製薬社製)、GIT 培地 (日本製薬社製)、EX-CELL302 培地 (JRH 社製)、IMDM (GIBCO BRL 社製)、Hybridoma-SFM (GIBCO BRL 社製)、またはこれら培地に FCS などの各種添加物を添加した培地などを用いることができる。得られた形質転換細胞を培地中で培養することで培養上清中にヒト化抗体を発現蓄積させることができる。培養上清中のヒト化抗体の発現量および抗原結合活性は、ELISA により測定できる。また、形質転換細胞は、特開平 2-257891 に開示されている方法に従い、dhfr 増幅系などを利用してヒト化抗体の発現量を上昇させることができる。

ヒト化抗体は、形質転換細胞の培養上清よりプロテイン A カラムを用いて精製することができる (Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 8, 1988; Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press Limited, 1996)。また、その他に通常、蛋白質の精製で用いられる精製方法を使用することができる。例えば、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィーおよび限外濾過等を組み合わせて行い、精製することができる。

精製したヒト化抗体のH鎖、L鎖あるいは抗体分子全体の分子量は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動（以下、PAGEと表記する：Nature, 227, 680-685, 1970）やウエスタンブロッティング法（Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 12, 1988; Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press Limited, 1996）などで測定することができる。

（9）ヒト化抗体の活性評価

培養上清中あるいは精製した抗hIGFヒト化抗体のhIGFに対する結合活性は、上記1（7）に示したELISAおよびバイオセンサーピアコアなどにより測定することができる。また、上記1（7）に示したhIGF依存的な増殖を示す細胞株の in vivo あるいは in vitro の増殖に対する抗体の影響を検討することにより、hIGFの機能を阻害する本発明の抗体の活性を測定することができる。

3. 抗体断片の作製

抗体断片は、上記1および2に記載の抗hIGF抗体をもとに遺伝子工学的手法あるいは蛋白質化学的手法により、作製することができる。

遺伝子工学的手法としては、目的の抗体断片をコードする遺伝子を構築し、動物細胞、植物細胞、昆虫細胞、大腸菌などの適当な宿主を用いて発現、精製を行うなどの方法があげられる。

蛋白質化学的手法としては、ペプシン、パバインなどの蛋白質分解酵素を用いた部位特異的切断、精製などの方法があげられる。

抗体断片としては、Fab、F(ab')₂、Fab'、scFv、diabody、dsFv、CDRを含むペプチドなどがあげられる。

（1）Fabの作製

Fabは、蛋白質化学的にはIgGを蛋白質分解酵素パバインで処理することにより、作製することができる。パバインの処理後は、元の抗体がプロテインA結合性を有するIgGサブクラスであれば、プロテインAカラムに通すことで、IgG分子やFc断片と分離し、均一なFabとして回収することができる（Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, third edition, 1995）。プロテインA結合性を持たな

い IgG サブクラスの抗体の場合は、イオン交換クロマトグラフィーにより、Fab は低塩濃度で溶出される画分中に回収することができる (Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, third edition, 1995)。また、Fab は遺伝子工学的には、多くは大腸菌を用いて、また、昆虫細胞や動物細胞などを用いて作製することができる。例えば、上記 2 (2)、2 (4) および 2 (5) に記載の抗体の V 領域をコードする DNA を、Fab 発現用ベクターにクローニングし、Fab 発現ベクターを作製することができる。Fab 発現用ベクターとしては、Fab 用の DNA を組み込み発現できるものであればいかなるものも用いることができる。例えば、pIT106 (Science, 240, 1041-1043, 1988) などがあげられる。Fab 発現ベクターを適当な大腸菌に導入し、封入体あるいはペリプラズマ層に Fab を生成蓄積させることができる。封入体からは、通常蛋白質で用いられるリフォールディング法により、活性のある Fab とすることができ、また、ペリプラズマ層に発現させた場合は、培養上清中に活性を持った Fab が漏出する。リフォールディング後あるいは培養上清からは、抗原を結合させたカラムを用いることにより、均一な Fab を精製することができる (Antibody Engineering, A Practical Guide, W. H. Freeman and Company, 1992)。

(2) $F(ab')_2$ の作製

$F(ab')_2$ は、蛋白質化学的には IgG を蛋白質分解酵素ペプシンで処理することにより、作製することができる。ペプシンの処理後は、Fab と同様の精製操作により、均一な $F(ab')_2$ として回収することができる (Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, third edition, Academic Press, 1995)。また、下記 3 (3) に記載の Fab' を o-PDM やビスマレイミドヘキサンなどのようなマレイミドで処理し、チオエーテル結合させる方法や、DTNB[5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)]で処理し、S-S 結合させる方法によっても作製することができる (Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL PRESS, 1996)。

(3) Fab' の作製

Fab' は、上記 3 (2) に記載の $F(ab')_2$ をジチオスレイトールなどの還元剤で処理して得ることができる。また、Fab' は遺伝子工学的には、多くは大腸菌、また、昆

虫細胞や動物細胞などを用いて作製することができる。例えば、上記 2 (2)、2 (4) および 2 (5) に記載の抗体の V 領域をコードする DNA を、Fab' 発現用ベクターにクローニングし、Fab' 発現ベクターを作製することができる。Fab' 発現用ベクターとしては、Fab' 用の DNA を組み込み発現できるものであればいかなるものも用いることができる。例えば、pAK19 (BIO/TECHNOLOGY, 10, 163-167, 1992) などがあげられる。Fab' 発現ベクターを適当な大腸菌に導入し、封入体あるいはペリプラズマ層に Fab' を生成蓄積させることができる。封入体からは、通常蛋白質で用いられるリフォールディング法により、活性のある Fab' とすることができ、また、ペリプラズマ層に発現させた場合は、リゾチームによる部分消化、浸透圧ショック、ソニケーションなどの処理により菌を破碎し、菌体外へ回収させることができる。リフォールディング後あるいは菌の破碎液からは、プロテイン G カラムなどを用いることにより、均一な Fab' を精製することができる (Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL PRESS, 1996)。

(4) scFv の作製

scFv は遺伝子工学的には、ファージまたは大腸菌、また、昆虫細胞や動物細胞などを用いて作製することができる。例えば、上記 2 (2)、2 (4) および 2 (5) に記載の抗体の V 領域をコードする DNA を、scFv 発現用ベクターにクローニングし、scFv 発現ベクターを作製することができる。scFv 発現用ベクターとしては、scFv の DNA を組み込み発現できるものであればいかなるものも用いることができる。例えば、pCANTAB5E (Amersham-Pharmacia 社製)、pHFA (Human Antibodies & Hybridomas, 5, 48-56, 1994) などがあげられる。scFv 発現ベクターを適当な大腸菌に導入し、ヘルパーファージを感染させることで、ファージ表面に scFv がファージ表面蛋白質と融合した形で発現するファージを得ることができる。また、scFv 発現ベクターを導入した大腸菌の封入体あるいはペリプラズマ層に scFv を生成蓄積させることができる。封入体からは、通常蛋白質で用いられるリフォールディング法により、活性のある scFv とすることができ、また、ペリプラズマ層に発現させた場合は、リゾチームによる部分消化、浸透圧ショック、ソニケーションなどの処理により菌を破碎し、菌体外へ回収することができる。リフォールディング

後あるいは菌の破碎液からは、陽イオン交換クロマトグラフィーなどを用いることにより、均一な scFv を精製することができる (Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL PRESS, 1996)。

(5) diabody の作製

diabody は遺伝子工学的には、多くは大腸菌、また、昆虫細胞や動物細胞などを用いて作製することができる。例えば、上記 2 (2)、2 (4) および 2 (5) に記載の抗体の VH と VL をリンカーがコードするアミノ酸残基が 8 残基以下となるように連結した DNA を作製し、diabody 発現用ベクターにクローニングし、diabody 発現ベクターを作製することができる。diabody 発現用ベクターとしては、diabody の DNA を組み込み発現できるものであればいかなるものも用いることができる。例えば、pCANTAB5E (Amersham Pharmacia 社製)、pHFA (Human Antibodies Hybridomas, 5, 48, 1994) などがあげられる。diabody 発現ベクターを導入した大腸菌の封入体あるいはペリプラズマ層に diabody を生成蓄積させることができる。封入体からは、通常蛋白質で用いられるリフォールディング法により、活性のある diabody とすることができ、また、ペリプラズマ層に発現させた場合は、リゾチームによる部分消化、浸透圧ショック、ソニケーションなどの処理により菌を破碎し、菌体外へ回収することができる。リフォールディング後あるいは菌の破碎液からは、陽イオン交換クロマトグラフィーなどを用いることにより、均一な scFv を精製することができる (Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL PRESS, 1996)。

(6) dsFv の作製

dsFv は遺伝子工学的には、多くは大腸菌、また、昆虫細胞や動物細胞などを用いて作製することができる。まず、上記 2 (2)、2 (4) および 2 (5) に記載の抗体の VH および VL をコードする DNA の適当な位置に変異を導入し、コードするアミノ酸残基がシステインに置換された DNA を作製する。作製した各 DNA を dsFv 発現用ベクターにクローニングし、VH および VL の発現ベクターを作製することができる。dsFv 発現用ベクターとしては、dsFv 用の DNA を組み込み発現できるものであればいかなるものも用いることができる。例えば、pULI9 (Protein Engineering,

7, 697-704, 1994) などがあげられる。VH および VL の発現ベクターを適当な大腸菌に導入し、封入体あるいはペリプラズマ層に生成蓄積させることができる。封入体あるいはペリプラズマ層から VH および VL を得、混合し、通常蛋白質で用いられるリフォールディング法により、活性のある dsFv とすることができる。リフォールディング後は、イオン交換クロマトグラフィーおよびゲル濾過などにより、さらに精製することができる (Protein Engineering, 7, 697-704, 1994)。

(7) CDR ペプチドの作製

CDR を含むペプチドは、Fmoc 法あるいは tBoc 法等の化学合成法によって作製することができる。また、CDR を含むペプチドをコードする DNA を作製し、作製した DNA を適当な発現用ベクターにクローニングし、CDR ペプチド発現ベクターを作製することができる。発現用ベクターとしては、CDR ペプチドをコードする DNA を組み込み発現できるものであればいかなるものも用いることができる。例えば、pLEX (Invitrogen 社製)、pAX4a+ (Invitrogen 社製) などがあげられる。発現ベクターを適当な大腸菌に導入し、封入体あるいはペリプラズマ層に生成蓄積させることができる。封入体あるいはペリプラズマ層から CDR ペプチドを得、イオン交換クロマトグラフィーおよびゲル濾過などにより、精製することができる (Protein Engineering, 7, 697-704, 1994)。

(8) 抗体断片の活性評価

精製した抗体断片の hIGF に対する結合活性は、上記 1 (7) に示した ELISA およびバイオセンサーピアコアなどにより測定することができる。また、上記 1 (7) に示した hIGF 依存的な増殖を示す細胞株の in vivo あるいは in vitro の増殖に対する抗体の影響を検討することにより、hIGF の機能を阻害する本発明の抗体の活性を測定することができる。

4. 抗 hIGF 抗体を用いた hIGF の検出および定量法

本発明は、本発明の抗体を用いて、hIGF を免疫学的に検出および定量する方法に関する。従って、本発明の抗体は、後述する hIGF 介在性疾患および異常な hIGF の産生亢進により病態が進行する疾患の診断に用いることができる。

本発明の抗体を用いて、hIGF を免疫学的に検出および定量する方法としては、蛍光抗体法、ELISA、放射性物質標識免疫法（以下、RIA と表記する）、免疫組織染色法、免疫細胞染色法などの免疫組織化学染色法（ABC 法、CSA 法など）、サンドイッチ ELISA（単クローン抗体実験マニュアル、講談社サイエンティフィック、1987；続生化学実験講座 5、免疫生化学研究法、東京化学同人、1986）などがあげられる。

蛍光抗体法とは、分離した細胞あるいは組織などに、本発明の抗体を反応させ、さらにフルオレセインイソチオシアネート（以下、FITC と表記する）などの蛍光物質で標識した抗 Ig 抗体あるいは抗体断片を反応させた後、蛍光色素をフローサイトメーターで測定する方法である。

RIA とは、分離した細胞あるいはその破砕液、組織あるいはその破砕液、細胞培養上清、血清、胸水、腹水、眼液などに、本発明の抗体を反応させ、さらに放射線標識を施した抗 Ig 抗体あるいは抗体断片を反応させた後、シンチレーションカウンターなどで測定する方法である。

免疫組織染色法、免疫細胞染色法とは、分離した細胞あるいは組織などに、本発明の抗体を反応させ、さらに FITC などの蛍光物質、ペルオキシダーゼ、ビオチンなどの酵素標識を施した抗 Ig 抗体あるいは抗体断片を反応させた後、顕微鏡を用いて観察する方法である。

サンドイッチ ELISA とは、本発明の抗体で、抗原認識部位の異なる 2 種類の抗体のうち、あらかじめ一方の抗体は ELISA プレートに吸着させ、もう一方の抗体は FITC などの蛍光物質、ペルオキシダーゼ、ビオチンなどの酵素で標識しておき、抗体吸着プレートに、分離した細胞あるいはその破砕液、組織あるいはその破砕液、細胞培養上清、血清、胸水、腹水、眼液などを反応させた後、標識した抗体を反応させ、標識物質に応じた反応を行う方法である。

5.hIGF 介在性疾患および異常な hIGF の産生亢進により病態が進行する疾患の診断および治療

本発明の抗 hIGF 抗体およびその抗体断片は、hIGF-I および hIGF-II と特異的に結合し、かつ、その機能を阻害するため、hIGF 介在性疾患および異常な hIGF の産

生亢進により病態が進行する疾患などの診断、治療において有用であると考えられる。また、ヒト化抗体は、ヒト以外の動物の抗体に比べ、ヒト抗体のアミノ酸配列に由来する部分がほとんどであるため、ヒト体内において免疫原性を示さず、反復投与が可能であり、かつ、その効果が長期間に渡り持続することが期待される。

hIGF 介在性疾患および異常な hIGF の産生亢進により病態が進行する疾患の診断方法としては、被験者の細胞、組織あるいは血清等の生体試料中に存在する hIGF を上記 4 に記載した免疫学的に検出する方法があげられる。

本発明の抗 hIGF 抗体およびその抗体断片は、単独で投与することも可能ではあるが、通常は薬理学的に許容される 1 つあるいはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。

投与経路は、治療に際して最も効果的なものを使用するのが望ましく、経口投与、または口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内および静脈内などの非経口投与をあげることができ、蛋白質またはペプチド製剤の場合、望ましくは静脈内投与をあげることができる。

投与形態としては、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、軟膏、テープ剤などがあげられる。経口投与に適当な製剤としては、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤などがあげられる。

乳剤およびシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール、果糖などの糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコールなどのグリコール類、ごま油、オリーブ油、大豆油などの油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類などの防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミントなどのフレーバー類などを添加剤として用いて製造できる。

カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤などは、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトールなどの賦形剤、デンプン、アルギン酸ナトリウムなどの崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルクなどの滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチンなどの結合剤、脂肪酸エステルなどの界面活性剤、グリセリンなどの可塑剤などを添加剤として用いて製造できる。

非経口投与に適切な製剤としては、注射剤、座剤、噴霧剤などがあげられる。注射剤は、塩溶液、ブドウ糖溶液あるいは両者の混合物からなる担体などを用いて調製される。

座剤はカカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸などの担体を用いて調製される。また、噴霧剤は該抗体および抗体断片そのもの、ないしは受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ該抗体および抗体断片を微細な粒子として分散させ吸収を容易にさせる担体などを用いて調製される。

担体として具体的には乳糖、グリセリンなどが例示される。該抗体および抗体断片、さらには用いる担体の性質により、エアロゾル、ドライパウダーなどの製剤が可能である。また、これらの非経口剤においても経口剤で添加剤として例示した成分を添加することもできる。

投与量または投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、体重などにより異なるが、通常成人1日当たり $10\mu\text{g/kg}$ ~ 10mg/kg である。

図面の簡単な説明

第1図は、抗hIGFラットモノクローナル抗体のhIGF-Iに対する特異的な反応性を示す（結合ELISA）。

第2図は、抗hIGFラットモノクローナル抗体の液相系における天然の立体構造を有するhIGF-Iに対する反応性を示す（競合ELISA）。

第3図は、抗hIGFラットモノクローナル抗体KM1468のhIGF-Iに対する結合における各種ペプチドによる阻害活性を示す。横軸が各種ペプチド濃度（ $\mu\text{g/mL}$ ）、縦軸が結合活性（%）を示す。用いた各種ペプチドについては、図中に示した。

第4図は、抗hIGF抗体KM1468のhIGF-IおよびhIGF-IIへの結合に対する、hIGF-I、hIGF-IIおよびヒトインスリンでの阻害活性を示した図である。AがKM1468とhIGF-Iとの結合、BがKM1468とhIGF-IIとの結合に対する各因子による阻害をそれぞれ示す。横軸が各種因子濃度（ $\mu\text{g/mL}$ ）、縦軸が因子非添加時を100%としたときの結合活性（%）を示す。■がhIGF-I、○がhIGF-II、△がヒトインスリンを添加したときの反応性をそれぞれ示す。

第5図は、抗hIGF抗体KM1468、sm1.2およびS1F2のhIGFおよびヒトインスリンによるヒト乳癌細胞株MCF7の増殖に対する影響を示す。Aが各因子による細胞増殖活性を示す。横軸が各種因子濃度 ($\mu\text{g/mL}$)、縦軸が増殖 (OD450) を示す。○がhIGF-I、●がhIGF-II、□がヒトインスリンの活性をそれぞれ示す。BがhIGF-I、CがhIGF-II、Dがヒトインスリンによる増殖活性に対する各種抗体の影響をそれぞれ示す。横軸が抗体濃度 ($\mu\text{g/mL}$)、縦軸が増殖 (OD450) をそれぞれ示す。細点線は抗体非添加時の増殖を、点線は各因子非添加時の増殖をそれぞれ示す。○がKM1468、□がsm1.2、■がS1F2の活性をそれぞれ示す。

第6図は、抗hIGF抗体KM1468、sm1.2およびS1F2のhIGFおよびヒトインスリンによるヒト大腸癌細胞株HT-29の増殖に対する影響を示す。Aが各因子による細胞増殖活性を示す。横軸が各種因子濃度 (ng/mL)、縦軸が増殖 (OD450) を示す。○がhIGF-I、●がhIGF-II、□がヒトインスリンの活性をそれぞれ示す。BがhIGF-I、CがhIGF-II、Dがヒトインスリンによる増殖活性に対する各種抗体の影響をそれぞれ示す。横軸が抗体濃度 ($\mu\text{g/mL}$)、縦軸が増殖 (OD450) をそれぞれ示す。細点線は抗体非添加時の増殖を、点線は各因子非添加時の増殖をそれぞれ示す。○がKM1468、□がsm1.2、■がS1F2の活性をそれぞれ示す。

第7図は、抗hIGF抗体KM1468、sm1.2およびS1F2のhIGFおよびヒトインスリンによるヒト骨肉腫細胞株MG63の増殖に対する影響を示す。Aが各因子による細胞増殖活性を示す。横軸が各種因子濃度 (ng/mL)、縦軸が増殖 (OD450) を示す。○がhIGF-I、●がhIGF-II、□がヒトインスリンの活性をそれぞれ示す。BがhIGF-I、CがhIGF-II、Dがヒトインスリンによる増殖活性に対する各種抗体の影響をそれぞれ示す。横軸が抗体濃度 ($\mu\text{g/mL}$)、縦軸が増殖 (OD450) をそれぞれ示す。細点線は抗体非添加時の増殖を、点線は各因子非添加時の増殖をそれぞれ示す。○がKM1468、□がsm1.2、■がS1F2の活性をそれぞれ示す。

第8図は、プラスミドpBS(II)SK(-)/hIGF-1およびpKANTEX93/hIGF-Iの造成工程を示した図である。

第9図は、A549/hIGF-I細胞におけるhIGF-Iの発現を示した図である。Aは、組換えhIGF-I蛋白質による阻害度を示す。横軸は添加した組換えhIGF-I蛋白質の濃度、

縦軸は発色 (OD415) を示す。Bは、A549細胞およびA549/hIGF-I細胞の培養上清中に含まれるhIGF-Iを示す。白抜きはA549細胞、網掛けはA549/hIGF-I細胞をそれぞれ示す。

第10図は、KM1468のhIGF-I発現細胞に対する細胞増殖阻害効果を示す。破線は抗hIGF抗体KM1468非添加のA549/hIGF-I細胞の増殖性を、実線は抗hIGF抗体KM1468非添加のA549細胞の細胞増殖をそれぞれ示す。■は抗hIGF抗体KM1468を添加したA549/hIGF-I細胞の増殖性を、○は抗hIGF抗体KM1468を添加したA549細胞の増殖性をそれぞれ示す。

第11図は、KM1468の足場非依存性増殖阻害効果を示した図である。図中の白抜きのカラムはA549細胞のコロニー形成数を、網掛けのカラムはA549/hIGF-I細胞の形成数を、黒塗りのカラムは抗hIGF抗体KM1468を添加したA549/hIGF-I細胞の形成数をそれぞれ示す。

第12図は、抗hIGF抗体KM1468の抗腫瘍効果を示した図である。横軸は腫瘍移植後の経過日数を、縦軸は腫瘍体積をそれぞれ示す。A549細胞を移植したマウスのうち、●は抗hIGF抗体KM1468非添加時を、○は抗hIGF抗体KM1468添加時をそれぞれ示す。A549/hIGF-I細胞を移植したマウスのうち、■は抗hIGF抗体KM1468非添加時を、□は抗hIGF抗体KM1468添加時をそれぞれ示す。

第13図は、プラスミド pKM1468VH および pKM1468VL の造成工程を示した図である。

第14図は、プラスミド pKANTEX1468Chi の造成工程を示した図である。

第15図は、精製した抗hIGFキメラ抗体KM3002のSDS-PAGE (4~15%グラジエントゲルを使用) の電気泳動パターンを示した図である。左側が非還元条件、右側が還元条件でそれぞれ電気泳動を行った図である。レーンMが非還元時は高分子量マーカおよび還元時は低分子量マーカ、レーン1がKM3002の泳動パターンをそれぞれ示す。

第16図は、抗hIGFラット抗体KM1468および抗hIGFキメラ抗体KM3002のhIGF-Iに対する反応をそれぞれ示す。横軸が抗体濃度 ($\mu\text{g/mL}$)、縦軸が結合活性 (OD415) をそれぞれ示す。○がKM1468、●がKM3002の反応性をそれぞれ示す。

第17図は、抗hIGF抗体KM1468、sm1.2、S1F2および抗hIGFキメラ抗体KM3002のhIGFによるヒト大腸癌細胞株HT-29の増殖に対する影響を示す。AがhIGF-I、BがhIGF-IIによる増殖活性に対する各種抗体の影響を示す。横軸が抗体濃度 ($\mu\text{g/mL}$)、縦軸が増殖 (OD450) をそれぞれ示す。細点線は抗体非添加時の増殖を、点線は各因子非添加時の増殖をそれぞれ示す。○がKM1468、●がKM3002、△がsm1.2、▲がS1F2の活性をそれぞれ示す。

以下に実施例により、本発明を説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

発明を実施するための最良の形態

実施例1 hIGF-I に対する抗体の作製

(1) 動物の免疫と抗体産生細胞の調製

組換え型 hIGF-I (R&D 社製) は、免疫原性を高める目的で以下の方法でメチル化 BSA (SIGMA 社製) とのコンジュゲートを作製し、免疫原とした。すなわち、2 回蒸留水に溶解したメチル化 BSA を、メチル化 BSA:hIGF-I=1:4 (重量比) になるように 4°C で混合し、10 秒間ボルテックスミキサーで攪拌した。その後、連結針付きシリンジを用いて完全フロインドアジュバントあるいは不完全フロインドアジュバントと容量比 1:1 で混合し、免疫原 (以下、メチル化 BSA-hIGF-I アジュバンドと表記する) とした。

5 週令雌 SD ラットに、完全フロインドアジュバントを用いて上記のように調製したメチル化 BSA-hIGF-I アジュバンド (100 μg の hIGF-I 相当量) を投与し、2 週間後より不完全フロインドアジュバントを用いて同様に調製した免疫原を 1 週間に 1 回、計 4 回投与した。

眼底静脈叢より採血し、その血清中の抗体価を実施例 1 (4) に示す結合 ELISA で調べ、十分な抗体価を示したラットから最終免疫 3 日後に脾臓を摘出した。

脾臓を MEM (日水製薬社製) 中で細断し、ピンセットでほぐし、遠心分離 (1200 rpm、5 分間) した後、上清を捨て、トリス-塩化アンモニウム緩衝液 (pH7.65) で 1~2 分間処理し、赤血球を除去し、MEM で 3 回洗浄し、細胞融合に用いた。

(2) マウス骨髓腫細胞の調製

8-アザグアニン耐性マウス骨髓腫細胞株 P3-U1 を通常培地で培養し、細胞融合時に 2×10^7 個以上の細胞を確保して、細胞融合に使用した。

(3) ハイブリドーマの作製

実施例 1 (1) で得られたラット脾細胞と (2) で得られた骨髓腫細胞とを 10:1 になるよう混合し、遠心分離 (1200 rpm、5 分間) した後、上清を捨て、沈澱した細胞に 37°C で攪拌しながら、 1.0×10^2 個のラット脾細胞あたり 0.2~1.0 mL の融合培地 (2g の PEG-1000、2 mL の MEM、0.7 mL のジメチルスルホキシドの混液) を加え、1~2 分間毎に 1~2 mL の MEM を数回加えた後、さらに、MEM を加えて全量が 50 mL になるようにした。遠心分離 (900 rpm、5 分間) した後、上清を捨て、緩やかに細胞をほぐした後、100 mL の HAT 培地 {通常培地 [RPMI-1640 培地に 1.5 mM グルタミン、50 μ M 2-メルカプトエタノール、10 μ g/mL ジェンタマイシンおよび 10% 牛胎児血清 (以下、FCS と表記する) を加えた培地] に 0.1 mM ヒポキサンチン、15 μ M チミジンおよび 0.4 μ M アミノプテリンを加えた培地} に懸濁した。

この懸濁液を 96 ウェル培養用プレートに 100 μ L/ウェルずつ分注し、5%CO₂ インキュベーター中、37°C で 10~14 日間培養した。この培養上清を実施例 1 (4) に示す結合 ELISA を用いて、メチル化 BSA-hIGF-I に反応して、陰性対照であるメチル化 BSA-BSA [BSA を用いて上記実施例 1 (1) と同様の反応を行い作製したコンジュゲート] に反応しないウェルを選び、さらに HT 培地 (HAT 培地からアミノプテリンを除いた培地) と通常培地に換え、2 回の単一細胞化を行い、抗 hIGF-I ラットモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを確立した。

その結果、第 1 図に示した反応性を有する KM1468、KM1469、KM1470、KM1471、KM1472 および KM1473 の 6 クローンのハイブリドーマを取得した。各ハイブリドーマが産生する抗体のサブクラスを、サブクラスタイピングキットを用いた ELISA により検討した結果、いずれも IgG2b であった。

(4) モノクローナル抗体の選択 (結合 ELISA)

ELISA プレートに固定化する抗原としては、実施例 1 (1) で作製したメチル化 BSA-hIGF-I および陰性対照としてメチル化 BSA-BSA を用いた。96 ウェル ELISA プ

レート (Greiner 社製) に、上述の抗原を hIGF-I あるいは BSA の濃度として $10\mu\text{g/mL}$ で $50\mu\text{L}$ /ウェルで分注し、 4°C で一晩放置して吸着させた。PBS で洗浄後、1%BSA を含む PBS (以下、BSA-PBS と表記する) を $100\mu\text{L}$ /ウェルで加え、室温で 1 時間反応させて残存する活性基をブロックした。BSA-PBS を捨て、被免疫ラット抗血清、抗 hIGF-I モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの培養上清あるいは精製した抗 hIGF-I ラットモノクローナル抗体を $50\mu\text{L}$ /ウェルで分注し、室温で 2 時間反応させた。反応後、各ウェルを 0.05%Tween 20 を含む PBS (以下、Tween-PBS と表記する) で洗浄後、4000 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ラット Ig 抗体 (DAKO 社製) を二次抗体として $50\mu\text{L}$ /ウェルで加えて室温で 1 時間反応させた。反応後、Tween-PBS で洗浄後、ABTS 基質液 [2, 2'-アジノ-ビス (3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸) アンモニウム の 0.55g を 1L の 0.1M クエン酸緩衝液 ($\text{pH}4.2$) に溶解し、使用直前に過酸化水素水を $1\mu\text{L/mL}$ で添加した溶液] を $50\mu\text{L}$ /ウェルで加えて発色させ、 415nm の吸光度 (以下、 OD_{415} と表記する) をプレートリーダー Emax (Molecular Devices 社製) を用いて測定した。

(5) モノクローナル抗体の精製

プリスタン処理した 8 週令 Balb/c ノード雌マウスに実施例 1 (3) で得られたハイブリドーマクローンを $5\sim 20\times 10^6$ 細胞/匹でそれぞれ腹腔内注射した。10~21 日後に、ハイブリドーマが腹水癌化したマウスから、腹水を採取 ($1\sim 8\text{mL}$ /匹) し、遠心分離 (3000 rpm 、5 分間) して固形分を除去した。その後、カプリル酸沈殿法 (Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988) により IgG 画分を精製し、精製モノクローナル抗体とした。

実施例 2 抗 hIGF-I ラットモノクローナル抗体の反応性の検討

(1) hIGF-I の天然の立体構造に対する反応性

実施例 1 (3) で選択された抗 hIGF-I ラットモノクローナル抗体の液相系における天然の立体構造を保つ hIGF-I に対する反応性を、以下に示す競合 ELISA で調べた。

実施例 1 (4) に示した、実施例 1 (1) で作製したメチル化 BSA-hIGF-I を固定化したプレートを用意し、20 μ g/mL より 5 倍希釈で段階的に希釈した hIGF-I を 50 μ L/ウェルで分注後、抗 hIGF-I ラットモノクローナル抗体の精製抗体を希釈した溶液 (KM1468:6.0 μ g/mL、KM1470:1.0 μ g/mL、KM1471:0.16 μ g/mL、KM1472:7.0 μ g/mL、KM1473:1.2 μ g/mL) を 50 μ L/ウェルで分注し、混合して室温で 2 時間反応させた。反応後、Tween-PBS で洗浄後、4000 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ラット Ig 抗体 (DAKO 社製) を 50 μ L/ウェルで加えて室温で 1 時間反応させた。反応後、Tween-PBS で洗浄後、ABTS 基質液 [2, 2'-アジノ-ビス (3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸) アンモニウム] の 0.55g を 1L の 0.1M クエン酸緩衝液 (pH4.2) に溶解し、使用直前に過酸化水素水を 1 μ L/mL で添加した溶液] を 50 μ L/ウェルで加えて発色させ、OD415 をプレートリーダー Emax (Molecular Devices 社製) を用いて測定した。

第 2 図に示したように、抗 hIGF-I ラットモノクローナル抗体はいずれも hIGF-I の液層中の天然の立体構造と反応性を示した。また、本系において、最も高い感度を示した KM1468 では、液相系に含まれる 16ng/mL までの濃度の天然の立体構造を有する hIGF-I を検出可能であった。

(2) 抗 hIGF 抗体 KM1468 の hIGF-I の競合的 ELISA での反応性

抗 hIGF 抗体 KM1468 は、実施例 2 (1) において hIGF-I の立体構造を認識している可能性が示唆された。しかしながら、KM1468 は、アミノ酸一次配列を認識している可能性も考えられるため、hIGF-I 部分ペプチドとの反応性を解析した。

(2-1) hIGF-I の部分ペプチドの合成

W001/64754 に記載の方法に従って、hIGF-I の部分ペプチドを合成した。合成したペプチドは、hIGF-I の 1-18 番目 (配列番号 17、以下、p1-18 と表記する)、14-30 番目 (配列番号 18、以下、p14-30 と表記する)、24-35 番目 (配列番号 19、以下、p24-35 と表記する)、29-41 番目 (配列番号 20、以下、p29-41 と表記する)、36-47 番目 (配列番号 21、以下、p36-47 と表記する)、41-56 番目 (配列番号 22、以下、p41-56 と表記する)、52-70 番目 (配列番号 23、以下、p52-70 と表記する)、53-61 番目 (配列番号 24、以下、p53-61 と表記する)、61-70 番目 (配

列番号 25、以下、p61-70 と表記する) に相当するペプチドであり、hIGF-I の全長を網羅するように設計した。上記ペプチドにおいては、内部に存在する Cys については、Ser あるいは Ala に置換した配列を合成した。また、41-56 番目に相当する配列については、内部の Cys を有する配列 (配列番号 26、以下、p41-56C と表記する) も合成した。

(2-2) 抗 hIGF 抗体 KM1468 の抗原認識部位の解析

上記 (2-1) で合成した各種ペプチドを用いて、抗 hIGF 抗体 KM1468 の抗原認識部位の解析を以下に示す競合 ELISA で検討した。

実施例 1 (4) に示したように抗原を固定化したプレートを用意し、4.0 $\mu\text{g/mL}$ に希釈した抗 hIGF 抗体 KM1468 を 50 μL /ウェルで分注後、50 $\mu\text{g/mL}$ より 3 倍希釈で段階的に希釈した各種ペプチド溶液の単独あるいは種々の組合せ、あるいは hIGF-I を 50 μL /ウェルで分注し、混合して室温で 1 時間反応させた。反応後、Tween-PBS で洗浄後、二次抗体として 4000 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ラット Ig 抗体 (DAKO 社製) を 50 μL /ウェルで加えて室温で 1 時間反応させた。反応後、Tween-PBS で洗浄後、ABTS 基質液 [2, 2'-アジノ-ビス (3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸) アンモニウム 0.55g を 1L の 0.1M クエン酸緩衝液 (pH4.2) に溶解し、使用直前に過酸化水素水を 1 $\mu\text{L/mL}$ で添加した溶液] を 50 μL /ウェルで加えて発色させ、OD415 をプレートリーダー Emax (Molecular Devices 社製) を用いて測定した。結果は、抗体のみを添加した時の OD415 を 100 とした相対値 (%) で表示した。

第 3 図に示したように、抗 hIGF 抗体 KM1468 の hIGF-I に対する結合は、hIGF-I により濃度依存的に阻害されたが、各種ペプチドでは、単独あるいは組合せに拘わらず、阻害活性は認められなかった。以上の結果は、KM1468 が、hIGF-I の単なるアミノ酸一次配列ではなく、hIGF-I の立体構造を認識していることを強く示唆する。

(3) 抗 hIGF 抗体 KM1468 の競合的 ELISA による交差反応性の確認

精製した抗 hIGF 抗体 KM1468 の hIGF-II およびヒトインスリンに対する交差反応性を、以下に示した競合 ELISA で検討した。抗原としては、hIGF-I (Pepro Tech

社製)、hIGF-II (Pepro Tech 社製) およびヒトインスリン (和光純薬社製) を使用した。

実施例 1 (1) で作製したメチル化 BSA-hIGF-I 抗原、あるいは実施例 1 (1) と同様に作製したメチル化 BSA-hIGF-II 抗原を、実施例 1 (4) に示した方法に従って、メチル化 BSA-hIGF-I 抗原は $0.1\mu\text{g/mL}$ の濃度で、メチル化 BSA-hIGF-II 抗原は $1.0\mu\text{g/mL}$ の濃度でそれぞれ固定化したプレートを準備し、 $0.6\mu\text{g/mL}$ に希釈した KM1468 を $25\mu\text{L}$ /ウェルで分注後、 $20\mu\text{g/mL}$ より 4 倍希釈で段階的に希釈した hIGF-I、hIGF-II あるいはヒトインスリンを $25\mu\text{L}$ /ウェルで分注し、混合して室温で 1 時間反応させた。反応後、Tween-PBS で洗浄後、二次抗体として抗 hIGF 抗体 KM1468 の場合は、1000 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ラット Ig 抗体 (DAKO 社製) を $50\mu\text{L}$ /ウェルで加えて使用した。反応後、Tween-PBS で洗浄後、ABTS 基質液 [2, 2'-アジノ-ビス (3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸) アンモニウム 0.55g を 1L の 0.1M クエン酸緩衝液 (pH4.2) に溶解し、使用直前に過酸化水素水を $1\mu\text{L/mL}$ で添加した溶液] を $50\mu\text{L}$ /ウェルで加えて発色させ、OD415 をプレートリーダー Emax (Molecular Devices 社製) を用いて測定した。結果は、抗体のみを添加した時の OD415 を 100 として相対値 (%) で表示した。

結果を第 4 図に示した。第 4 図 A に示したように、抗 hIGF 抗体 KM1468 の hIGF-I に対する結合は、hIGF-I および hIGF-II で強く阻害された。同様に、第 4 図 B に示したように、抗 hIGF 抗体 KM1468 の hIGF-II に対する結合は、hIGF-I および hIGF-II で強く阻害された。また、これらの阻害は hIGF-I あるいは hIGF-II でそれぞれ同程度であった。すなわち、抗 hIGF 抗体 KM1468 は、hIGF-I と hIGF-II の両方に同程度の強さで反応できることを示している。一方、抗 hIGF 抗体 KM1468 の hIGF-I あるいは hIGF-II への結合は、ヒトインスリンでは阻害されなかった。

実施例 3 抗 IGF 抗体と IGF との反応性の確認

KM1468 と二種類の市販抗 hIGF 抗体との、抗原への反応性の比較を以下のようにして検討した。抗体としては、抗 hIGF 抗体 KM1468、市販の抗 hIGF-I 抗体である sm1.2 (Upstate biotechnology 社製) および市販の抗 hIGF-II 抗体である S1F2

(Upstate biotechnology 社製) を用いた。抗原としては、hIGF-I (Pepro Tech 社製)、hIGF-II (Pepro Tech 社製) およびヒトインスリン (和光純薬社製) を使用した。

(1) 表面プラズモン共鳴を用いた結合強度の測定

抗 hIGF 抗体 KM1468 と、抗原である hIGF-I あるいは hIGF-II に対する結合活性を解析するために、抗 hIGF 抗体 KM1468、市販の抗 hIGF-I 抗体 sm1.2、および市販の抗 hIGF-II 抗体 S1F2 の 3 種の抗体の、hIGF-I および hIGF-II に対する結合強度を表面プラズモン共鳴 (surface plasmon resonance) を利用したバイオセンサー Biacore2000 (ピアコア社製) を用いて以下のように測定した。アナライトの希釈並びに測定中の反応緩衝液としては、HBS-EP (10mM HEPES、150mM NaCl、3mM EDTA、0.005% Tween20 pH7.4) (ピアコア社製) を用いた。

センサーチップ CM-5 (ピアコア社製) に、アミンカップリング (ピアコア社製) を用いて、 36.0pg/mm^2 で hIGF-I をあるいは 41.7pg/mm^2 で hIGF-II を固定化し、測定物として $20\mu\text{g/mL}$ より 2 倍希釈で 6 段階に希釈した 3 種類の抗体を、流速 $20\mu\text{L/分}$ で 2 分間添加した後、5 分間にわたって測定物の解離を観察した。反応は 25°C で行った。各濃度における結合反応曲線から、結合速度定数 K_{ass} 、並びに解離速度定数 K_{diss} を算出し、これから各抗体の結合定数 $K_A (\text{M}^{-1})$ を算出した。結合定数 K_A は、 $K_A = K_{\text{ass}}/K_{\text{diss}}$ で計算される。

第 1 表

	KM1468	sm1.2	S1F2
$K_A (\text{hIGF-I})$	7.86×10^9	1.86×10^8	4.62×10^8
$K_A (\text{hIGF-II})$	8.63×10^9	7.35×10^7	2.40×10^9

結果を第 1 表に示した。抗 hIGF 抗体 KM1468 の hIGF-I に対する K_A は $7.86 \times 10^9 \text{M}^{-1}$ であり、hIGF-II に対する K_A は $8.63 \times 10^9 \text{M}^{-1}$ であった。KM1468 の hIGF-I および hIGF-II に対する K_A の比は、ほぼ 1:1 であり、KM1468 は hIGF-I および hIGF-II

の両者に同程度に強力に結合できることが示された。一方、市販の抗 hIGF-I モノクローナル抗体 sm1.2 の hIGF-I に対する K_A は $1.86 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ 、hIGF-II に対する K_A は $7.35 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ であった。抗 hIGF 抗体 KM1468 の hIGF-I および hIGF-II に対する K_A は、市販の抗 hIGF-I 抗体 sm1.2 の K_A と比較して hIGF-I に対しては約 42 倍、hIGF-II に対しては約 120 倍であった。また、市販の抗 hIGF-II 抗体 S1F2 の hIGF-I に対する K_A は $4.62 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ 、hIGF-II に対する K_A は $2.4 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ であった。抗 hIGF 抗体 KM1468 の hIGF-I および hIGF-II に対する K_A は、市販の抗 hIGF-II 抗体 S1F2 の K_A と比較して hIGF-I に対しては約 18 倍、hIGF-II に対しては約 3.6 倍であった。すなわち抗 hIGF 抗体 KM1468 は、市販の抗 hIGF-I 抗体である sm1.2 および市販の抗 hIGF-II 抗体である S1F2 と比較して、hIGF-I、hIGF-II のそれぞれに強い結合力を有していることが示された。

(2) 抗 hIGF 抗体の hIGF 依存性増殖に対する影響

ヒト乳癌細胞株 MCF7 (ATCC HTB-22)、ヒト大腸癌細胞株 HT-29 (ATCC HTB-38) あるいはヒト骨肉腫細胞株 MG-63 (ATCC CRL-1427) を TF/BSA 培地 [D-MEM/F-12 (Gibco BRL 社製) に $10 \mu\text{g/mL}$ のヒトトランスフェリン (Gibco BRL 社製)、 $200 \mu\text{g/mL}$ の BSA を添加した培地] で $0.5 \sim 1 \times 10^5$ 細胞/mL に調製し、96 ウェル培養用プレートに $100 \mu\text{L}$ /ウェルで分注した。さらに、TF/BSA 培地で各濃度に希釈した hIGF-I (Pepro Tech 社製)、hIGF-II (Pepro Tech 社製) あるいはヒトインスリン (和光純薬社製) の各因子を $50 \mu\text{L}$ /ウェルで、TF/BSA 培地で各濃度に希釈した各抗体を $50 \mu\text{L}$ /ウェルで添加し、 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ インキュベーター内で 5 日間培養した。培養後、細胞増殖試薬 WST-1 (Roche 社製) を $20 \mu\text{L}$ /ウェルで分注し、さらに、 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ インキュベーター内で 2.5~4 時間培養した後に、OD450nm の吸光度 (以下、OD450 と表記する) をプレートリーダー Emax (Molecular Devices 社製) を用いて測定した。

第 5 図 A には、ヒト乳癌細胞株 MCF7 の各因子による増殖曲線をそれぞれ示した。さらに、第 5 図 B には、 40ng/mL の hIGF-I 存在下、第 5 図 C には、 100ng/mL の hIGF-II の存在下、第 5 図 D には、 100ng/mL のヒトインスリン存在下での、各抗体添加時の増殖をそれぞれ示した。第 5 図に示したように、抗 hIGF 抗体 KM1468 は、

hIGF-I および hIGF-II による細胞増殖を強く阻害し、その増殖阻害活性は、市販の抗 hIGF-I 抗体である sm1.2 および市販の抗 hIGF-II 抗体である S1F2 よりも高かった。一方、ヒトインスリンによる増殖に対しては、いずれの抗体も影響を与えなかった。以上の結果は、実施例 3 (1) および (2) の競合 ELISA で認められた各抗体の結合特異性と良く相関しており、また、各抗体の結合により、hIGF-I および hIGF-II の機能が阻害されることを明確に示したものである。

第 6 図 A には、ヒト大腸癌細胞株 HT-29 の各因子による増殖曲線をそれぞれ示した。さらに、第 6 図 B には、10ng/mL の hIGF-I 存在下、第 6 図 C には、10ng/mL の hIGF-II の存在下、第 6 図 D には、20ng/mL のヒトインスリン存在下での、各抗体添加時の増殖をそれぞれ示した。

第 6 図に示したように、抗 hIGF 抗体 KM1468 は、hIGF-I および hIGF-II による細胞増殖を同程度に強く阻害し、その増殖阻害活性は、市販の抗 hIGF-I 抗体である sm1.2 および市販の抗 hIGF-II 抗体である S1F2 よりも高かった。一方、ヒトインスリンによる増殖に対しては、いずれの抗体も影響を与えなかった。以上の結果は、実施例 3 (1) および (2) の競合 ELISA で認められた結合特異性と良く相関しており、また、各抗体の結合により、hIGF-I および hIGF-II の機能が阻害されることを明確に示したものである。さらに、第 6 図 B に示される hIGF-I 添加時の HT-29 細胞の培養に KM1468 を添加した場合、および第 6 図 C に示される hIGF-II 添加時の HT-29 細胞の培養に KM1468 あるいは S1F2 を添加した場合には、それぞれ点線で示される各種抗体および各種増殖因子を添加しない場合よりも、細胞の増殖は抑制された。すなわち、HT-29 細胞は、自ら hIGF-I あるいは hIGF-II を産生して増殖しており、このように細胞自らが産生した増殖因子による細胞の増殖効果も、抗 hIGF 抗体は阻害できる。

第 7 図 A には、ヒト骨肉腫細胞株 MG-63 の各因子による増殖曲線をそれぞれ示した。さらに、第 7 図 B には、20ng/mL の hIGF-I 存在下、第 7 図 C には、20ng/mL の hIGF-II の存在下、第 7 図 D には、20ng/mL のヒトインスリン存在下での、各抗体添加時の増殖をそれぞれ示した。第 7 図に示したように、抗 hIGF 抗体 KM1468 は、hIGF-I および hIGF-II による細胞増殖を同程度に強く阻害し、その増殖阻害活性

は、市販の抗 hIGF-I 抗体である sm1.2 および市販の抗 hIGF-II 抗体である S1F2 よりも高かった。一方、ヒトインスリンによる増殖に対しては、いずれの抗体も影響を与えなかった。以上の結果は、実施例 3 (1) および (2) の競合 ELISA で認められた各抗体の結合特異性と良く相関しており、また、各抗体の結合により、hIGF-I および hIGF-II の機能が阻害されることを明確に示したものである。

以上の 3 種類の細胞での、hIGF-I あるいは hIGF-II 依存的な細胞増殖の阻害活性は、抗 hIGF 抗体 KM1468 あるいは市販の抗 hIGF-I 抗体である sm1.2 あるいは抗 hIGF-II 抗体である S1F2 抗体のいずれにも認められた。この細胞増殖の阻害活性は、hIGF-I 依存的な増殖活性の場合には、抗 hIGF 抗体 KM1468 が最も高く、次いで、抗 hIGF-I 抗体 sm1.2、抗 hIGF-II 抗体 S1F2 であった。また、hIGF-II 依存的な増殖活性の場合には、抗 hIGF 抗体 KM1468 が最も高く、次いで、抗 hIGF-II 抗体 S1F2、抗 hIGF-I 抗体 sm1.2 であった。この結果は、実施例 3 (1) の表面プラズモン共鳴を用いて得られた結合強度の結果とよく一致しており、抗 hIGF 抗体 KM1468 は、hIGF-I と hIGF-II の両方に対する結合活性および hIGF-I あるいは hIGF-II 依存的な細胞の増殖阻害効果において、市販抗体と比較して優れていることを、明確に示している。

実施例 4 hIGF-I 発現細胞の増殖に対する抗 hIGF 抗体 KM1468 の影響

(1) hIGF-I 発現細胞の構築

以下のようにしてヒト肺癌細胞株 A549 細胞 (ATCC CCL-185) に hIGF-I 遺伝子を導入した形質転換体を作製した。

(1-1) hIGF-I 遺伝子のクローニングおよび発現ベクターの作製

1×10^7 個のヒト肺癌細胞株 PC-9 細胞 (British Journal of Cancer, 39, 15, 1976) から、RNA 調製キット RNeasy (QIAGEN 社製) を用いて、添付の使用説明書に従い、45.6 μ g の全 RNA を調製した。調製した全 RNA のうち 5 μ g を使用して、Superscript II (GIBCO-BRL 社製) を用いて、添付の使用説明書に従い、cDNA を合成した。

合成した cDNA を鋳型として、PCR によって hIGF-I 遺伝子をクローニングした。hIGF-I 遺伝子増幅用のプライマーとして、配列番号 27 と 28 に示した塩基配列をそれぞれ有する合成 DNA を設計した。それぞれの合成 DNA は 5' 末端にプラスミド pBluescript II SK(-) (Stratagene 社製)、並びに pKANTEX93 (W097/10354) ヘクローニングするための制限酵素認識配列を含んでいる。実際には、上述で得られたヒト肺癌細胞株 PC-9 細胞から合成した cDNA の 20ng を 50 μ L の KOD(+) DNA Polymerase 添付 KOD(+) Buffer #1 (東洋紡績社製)、0.2mM dNTPs、2mM 塩化マグネシウム、1 μ M の配列番号 27 と 28 に示した塩基配列をそれぞれ有する合成 DNA を含む緩衝液に添加し、DNA サーマルサイクラー GeneAmp PCR System 9600 (PERKIN ELMER 社製) を用いて、94°C にて 1 分間加熱した後、2.5 単位の KOD DNA Polymerase (東洋紡績社製) を添加し、94°C にて 30 秒間、62°C にて 30 秒間、72°C にて 30 秒間のサイクルを 30 サイクル行った。それぞれの反応液 50 μ L を制限酵素 Eco RI (Takara Shuzo 社製) および Sal I (Takara Shuzo 社製) で消化後、アガロースゲル電気泳動し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社製) を用いて、約 0.5kb の hIGF-1 をコードする遺伝子の PCR 産物を回収した。

次に、プラスミド pBluescript II SK(-) (Stratagene 社製) を制限酵素 Eco RI および Sal I で消化後、Calf Intestine Alkaline Phosphatase (以下、CIAP と表記する; Takara Shuzo 社製) で末端を脱リン酸化して得られた DNA 0.1 μ g と、上記で得られたそれぞれの PCR 産物約 0.1 μ g を滅菌水に加えて 7.5 μ L とし Ligation high (東洋紡績社製) 7.5 μ L を加えて 16°C で一晩反応させた。このようにして得られた組換えプラスミド DNA 溶液を用いて大腸菌 DH5 α 株 (東洋紡績社製) を形質転換した。形質転換株より各プラスミド DNA を調製し、BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Applied Biosystems 社製) を用いて添付の説明書に従い、反応を行い、塩基配列自動分析装置 ABI PRISM 377 (Applied Biosystems 社製) を用いて塩基配列を決定した。その結果、目的である hIGF-I をコードする遺伝子配列を有する第 8 図に示したプラスミド pBS(II)SK(-)/hIGF-I を得た。

次に、上記で得られた pBS(II)SK(-)/hIGF-I の hIGF-I をコードする遺伝子を含む制限酵素断片 (Eco RI-Kpn I) と pKANTEX93 の Eco RI-Kpn I 断片とを連結して、第 8 図に示したプラスミド pKANTEX93/hIGF-I を構築した。プラスミド pKANTEX93/hIGF-I の塩基配列を上記と同様に塩基配列自動分析装置 ABI PRISM 377 を用いて決定した。その結果、目的の hIGF-I をコードする遺伝子を含むプラスミド pKANTEX93/hIGF-I を得た。

(1-2) hIGF-I 形質転換体の作製

実施例 1 (1-1) で得られたプラスミド pKANTEX93/hIGF-I を動物細胞に導入して、hIGF-I 発現細胞を以下のように作製した。

プラスミド pKANTEX93/hIGF-I を制限酵素 AatII (東洋紡績社製) で処理して直鎖状化した後、8 μ g を 4×10^6 細胞のヒト肺癌細胞株 A549 細胞 (ATCC CCL-185) へエレクトロポレーション法 (Cytotechnology, 3, 133-140, 1990) により導入後、15mL の RPMI 培地 [10 % FCS、50 μ g/mL ゲンタマイシン (ナカライテスク社製) を含む RPMI1640 培地 (Invitrogen 社製)] に懸濁し、T75 フラスコ (スミロン社製) に移した。37°C、5%CO₂ インキュベーター内で 24 時間培養した後、G418 を 0.2mg/mL になるように添加して 1~2 週間培養した。G418 耐性を示す A549/hIGF-I 形質転換株 (以下、A549/hIGF-I と表記する) が取得された。

(1-3) A549/hIGF-I 細胞の培養上清に産生された hIGF-I の定量

実施例 3 (1-1) で作製した A549/hIGF-I 細胞内において導入した hIGF-I 遺伝子が発現して、該細胞が hIGF-I を産生しているかを確認するために、以下の実験を行った。

A549/hIGF-I 細胞あるいは A549 細胞を RPMI 培地で培養を行った後、培養上清を回収して、培養上清中に含まれる hIGF-I 量を以下の ELISA 法により測定した。

実施例 1 (4) に示した、メチル化 BSA-hIGF-I を固定化したプレートを準備し、陽性対象として 2 μ g/mL より 5 倍希釈で段階的に希釈した hIGF-I、あるいは A549/hIGF-I 細胞または A549 細胞の培養上清を 25 μ l /ウェルで分注後、BSA-PBS で 0.6 μ g/mL に希釈した抗 hIGF 抗体 KM1468 の精製抗体を分注し、混合して室温で 2 時間反応させた。反応後 Tween-PBS で洗浄後、1000 倍に希釈したペルオキシダー

ゼ標識ウサギ抗ラット Ig 抗体 (DAKO 社製) を 50 μ L / ウェルで分注し、室温 1 時間で反応させた。反応後、Tween-PBS で洗浄後、1000 倍希釈した抗ラット IgG-HRP (DAKO 社製) を 50 μ L / ウェルで分注し、室温で 1 時間反応させた。反応後、Tween-PBS で 5 回洗浄した後、ABTS 基質溶液 [2, 2'-アジノ-ビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)アンモニウム 0.55g を 1L の 0.1 M クエン酸緩衝液 (pH4.2) に溶解し、使用直前に過酸化水素水を 1 μ L / mL で添加した溶液] を 50 μ L / ウェルで加えて発色させ、OD415 をプレートリーダー Emax を用いて測定した。

結果を第 9 図に示す。第 9 図 A に示したように、hIGF-I 遺伝子が導入されていない A549 細胞の培養上清に対して hIGF-I 遺伝子が導入された A549/hIGF-I 細胞の培養上清では、明らかに結合活性は低下していることから、A549/hIGF-I 細胞は hIGF-I を発現していることが示された。

(1-4) 抗 hIGF 抗体 KM1468 の hIGF-I 発現細胞の増殖に対する影響

細胞自身が産生する hIGF-I に依存した細胞増殖 (以下オートクリン細胞増殖と表記する) を KM1468 が阻害できるかを、実施例 3 (1-1) で作製した hIGF-I 遺伝子導入細胞 A549/hIGF-I 細胞を用いて、調べた。

A549/hIGF-I 細胞あるいは A549 細胞を 10% FCS、50 μ g/mL ゲンタマイシン (ナカライテスク社製) を含む RPMI1640 培地 (Invitrogen 社製) (以下、RPMI 培地と表記する) で培養した後、それぞれ 2×10^5 個/mL の細胞密度になるように 10 μ g/mL のヒトトランスフェリン (GIBCO 社製)、200 μ g/mL BSA (Invitrogen 社製) を含む DMEM/F12 培地 (-FCS, -Phenol red) (Invitrogen 社製) (以下、無血清培地と表記する) に懸濁した。

A549/hIGF-I 細胞あるいは A549 細胞の細胞懸濁液を 96 ウェルプレート (スミロン社製) に 100 μ L / ウェルで分注した後、各ウェルに無血清培地で 200 μ g/mL より 5 倍希釈系で段階的に希釈した抗 hIGF 抗体 KM1468 を 100 μ L / ウェルで添加し、37°C、5%CO₂ インキュベーター内で 5 日間培養した。培養後、細胞増殖試薬 WST-1 (Roche 社製) を 20 μ L / ウェルで分注し、さらに、37°C、5%CO₂ インキュベーター内で 4 時間培養した後に、OD450nm の吸光度 (以下、OD450 と表記する) をプレートリーダー Emax (Molecular Devices 社製) を用いて測定した。

結果を第10図に示した。横軸は、培養時の各ウェル中の抗hIGF抗体 KM1468 濃度を示した。破線に示される抗hIGF抗体 KM1468 非添加の A549/hIGF-I 細胞の増殖性は、実線に示される hIGF-I を産生しない A549 細胞の増殖性と比較した場合、明らかに増加している。これは、A549/hIGF-I 細胞が自己産生する hIGF-I によって A549/hIGF-I 細胞自身の増殖を促すオートクリン増殖を示しているものである。この第10図に表されるようなオートクリン増殖は、A549/hIGF-I 細胞の培養時に抗体 KM1468 を添加した場合に、濃度依存的に阻害された。一方、A549 細胞の増殖性には、抗体 KM1468 は影響を及ぼさなかった。すなわち、抗hIGF抗体 KM1468 は、細胞自身が生産する hIGF-I によるオートクリン細胞増殖を阻害できることが示された。

(1-5) 抗hIGF抗体 KM1468 の hIGF-I 発現細胞の足場非依存性増殖への影響

癌化した細胞は、軟寒天中などの細胞接着のない浮遊状態にも関わらず増殖することができる足場非依存性増殖能を有している。この足場非依存性増殖能は、細胞の造腫瘍性と非常に密接に関連しており、hIGF-I が関与していると考えられている。KM1468 が細胞の足場非依存性増殖を阻害できるかを、実施例3(1-1)で作製した A549/hIGF-I 細胞を用いて、以下のようにして調べた。

暖めた 0.3% agar noble (Difco 社製) を含む、RPMI 培地 (以下、agar-RPMI 培地と記す) を、12 ウェルプレート (Costar 社製) に 1 mL/ウェルで分注し、数十分室温で放置してゲル化させたプレートを準備した。A549/hIGF-I 細胞あるいは A549 細胞を RPMI 培地で培養した後、 1×10^3 個/mL の細胞密度になるように暖めた agar-RPMI 培地に懸濁した。

A549/hIGF-I 細胞あるいは A549 細胞の細胞懸濁液を、1 mL/ウェルで各ウェルに層積した。数分間室温で放置し、ゲル化させた後、37°C、5%CO₂ インキュベーター内で4週間培養した。培養後、各ウェル内に形成されたコロニー数を顕微鏡下で測定した。

結果を第11図に示した。第11図に示したように hIGF-I を生産している A549/hIGF-I 細胞の足場非依存性の細胞増殖性は、A549 細胞の足場非依存性の細胞増殖性と比較して上昇していた。また、A549/hIGF-I 細胞の軟寒天中での培養時に

10 μ g/mL の抗 hIGF 抗体 KM1468 を添加した場合には、足場非依存性の細胞増殖は、KM1468 の添加により完全に阻害された。すなわち、足場非依存性の細胞増殖には hIGF-I が関与しており、hIGF-I 依存的な足場非依存性の細胞増殖は、抗 hIGF 抗体 KM1468 により阻害されることが示された。

(1-6) 抗 hIGF 抗体 KM1468 の hIGF-I 発現細胞に対する腫瘍増殖阻害効果

実施例 3 (1-1) で作製した A549/hIGF-I 細胞を用いて、hIGF-I が関与する *in vivo* 腫瘍形成に対する、抗 hIGF 抗体 KM1468 の腫瘍増殖阻害効果を、以下のよう

に検討した。

A549/hIGF-I 細胞あるいは A549 細胞を RPMI 培地で培養した後、それぞれ 1×10^6 個/mL の細胞密度になるように PBS に懸濁した。

A549/hIGF-I 細胞あるいは A549 細胞の細胞懸濁液の 100 μ L を 6 週齢、ヌードマウス Balb/c A/c-1 nu (メス) の右胸部に皮下移植した。マウス 1 匹当たりの移植した細胞数は、 1×10^7 個となる。移植直後から、マウス 1 匹につき 500 μ g の抗 hIGF 抗体 KM1468 を 1 週間に 2 回、合計 8 回にわたって尾静脈から投与した。陰性対象として、同一の腫瘍皮下移植マウスに対して PBS 投与を同時に行った。細胞移植から 5 日間経過時点から、腫瘍体積を測定した。腫瘍体積 (mm^3) は、腫瘍の長径、短径および高さから、長径 \times 短径 \times 高さ $\times 0.5236$ の式を用いて、算出した。

結果を第 12 図に示した。hIGF-I を生産しない A549 細胞と hIGF-I を生産している A549/hIGF-I 細胞を移植したマウスの間で、皮下腫瘍の増殖性を比較したとき、A549/hIGF-I 細胞を移植したマウスの皮下腫瘍の方が、腫瘍の増殖は亢進していた。また、A549/hIGF-I 細胞を移植したマウスでは、抗 hIGF 抗体 KM1468 を投与した場合、皮下腫瘍の増殖は、顕著に阻害された。このことは、抗 hIGF 抗体 KM1468 が、hIGF-I の阻害により *in vivo* においても腫瘍の増殖を阻害できることを明確に示している。

実施例 5 抗 hIGF-I キメラ抗体の作製

(1) 抗 hIGF 抗体 KM1468 の V 領域をコードする cDNA の単離、解析

(1-1) 抗 hIGF 抗体 KM1468 産生ハイブリドーマからの mRNA の調製

抗 hIGF 抗体 KM1468 産生ハイブリドーマ細胞 KM1468 (FERM BP7978) の 5×10^7 個より、mRNA の調製キットである Fast Track mRNA Isolation Kit (Invitrogen 社製) を用いて、添付の使用説明書に従い、KM1468 由来の mRNA を $27 \mu\text{g}$ 調製した。

(1-2) 抗 hIGF 抗体 KM1468 の H 鎖および L 鎖 cDNA ライブラリーの作製

実施例 5 (1-1) で取得した KM1468 の mRNA の $5 \mu\text{g}$ から、TimeSaver cDNA Synthesis Kit (Amersham Pharmacia 社製) を用いて、添付の使用説明書に従い、両端に EcoRI-NotI アダプター配列を有する cDNA を合成した。合成した cDNA の全量を $20 \mu\text{L}$ の滅菌水に溶解後、アガロースゲル電気泳動にて分画し、IgG クラス抗体の H 鎖に対応する約 1.5kb の cDNA 断片と κ クラスの L 鎖に対応する約 1.0kb の cDNA 断片を QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社製) を用いてそれぞれ約 $1.0 \mu\text{g}$ 回収した。次に、 λ ZAPII Predigested EcoRI/CIAIP-Treated Vector Kit (Stratagene 社製) を用いて、各々の約 1.5kb の cDNA 断片 $0.1 \mu\text{g}$ および約 1.0kb の cDNA 断片 $0.1 \mu\text{g}$ と、キットに添付されている制限酵素 EcoRI で消化後、Calf Intestine Alkaline Phosphatase で末端を脱リン酸化された λ ZAPII ベクターの $1 \mu\text{g}$ を、添付の使用説明書に従い、連結した。連結後の各々の反応液のうち $2.5 \mu\text{L}$ を Gigapack III Gold Packaging Extracts (Stratagene 社製) を用いて、添付の使用説明書に従い、 λ ファージにパッケージングし、KM1468 の H 鎖 cDNA ライブラリーとして 5.0×10^4 個、L 鎖 cDNA ライブラリーとして 4.0×10^4 個のファージクローンを取得した。次に、各々のファージを常法 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab. Press New York, 1989) に従い、ナイロンメンブレンフィルター HybondN⁺ (Amersham Pharmacia 社製) 上に固定した。

(1-3) 抗 hIGF 抗体 KM1468 の H 鎖および L 鎖の cDNA のクローニング

実施例 5 (1-2) で作製した KM1468 の H 鎖 cDNA ライブラリー、L 鎖 cDNA ライブラリーのナイロンメンブレンフィルターを、ECL Direct Nucleic Acid Labelling and Detection Systems (Amersham Pharmacia 社製) を用いて、添付の使用説明書に従い、マウス抗体の C 領域の cDNA [H 鎖はマウス C γ 2bcDNA の断片 (Nature, 283, 786-789 1980)、L 鎖はマウス C κ cDNA の断片 (Cell, 22, 197-207, 1980)] をプローブとして検出し、プローブに強く結合したファージクローンを H 鎖、L 鎖各 10

クローン取得した。次に、 λ ZAPII Predigested EcoRI/CIAP-Treated Vector Kit (Stratagene 社製) の使用説明書に従い、*in vivo* excision 法により各ファージクローンをプラスミドに変換した。こうして得られた各プラスミドに含まれる cDNA の塩基配列を BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Applied Biosystems 社製) を用いて、添付の使用説明書に従い、反応を行い、塩基配列自動分析装置 ABI PRISM 377 (Applied Biosystems 社製) を用いて決定した。その結果、cDNA の 5' 末端に開始コドンと推定される ATG 配列が存在する完全長の機能的な H 鎖 cDNA を含むプラスミド pKM1468H5-2 および L 鎖 cDNA を含むプラスミド pKM1468L5-1 を得た。

(1-4) 抗 hIGF 抗体 KM1468 の V 領域のアミノ酸配列の解析

プラスミド pKM1468H5-2 に含まれていた KM1468 の VH の全塩基配列を配列番号 1 に、それから推定された KM1468 の VH の全アミノ酸配列を配列番号 2 に、プラスミド pKM1468L5-1 に含まれていた KM1468 の VL の全塩基配列を配列番号 3 に、それから推定された KM1468 の VL の全アミノ酸配列を配列番号 4 にそれぞれ示した。なお、配列番号 2 および 4 に記載したアミノ酸配列にそれぞれ対応する塩基配列は、配列番号 1 および 3 に記載したもの以外に無数に存在するが、それらはすべて本発明の範囲に包含される。既知の抗体の配列データ (Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991) との比較および精製した抗 hIGF 抗体 KM1468 の VH および VL の N 末端アミノ酸配列をプロテインシーケンサー PPSQ-10 (Shimadzu 社製) を用いて解析した結果との比較から、単離した各々の cDNA は分泌シグナル配列を含む抗 hIGF 抗体 KM1468 の H 鎖および L 鎖をコードする完全長 cDNA であり、VH については、配列番号 2 に示したアミノ酸配列の -19 から -1 番目が、VL については、配列番号 4 に示したアミノ酸配列の -22 から -1 番目が分泌シグナル配列であることが明らかとなった。

次に、抗 hIGF 抗体 KM1468 の VH および VL のアミノ酸配列の新規性について検討した。配列解析システムとして GCG Package (version 10.0, Genetics Computer Group 社製) を用い、既存の蛋白質のアミノ酸配列データベース [SWISS-PROT (Release 39.0)、PIR-Protein (Release 65.0)] を BLAST 法 (Journal of

Molecular Biology, 215, 403-410, 1990) により検索した。その結果、VH および VL とともに完全に一致する配列は認められず、抗 hIGF 抗体 KM1468 の VH および VL は新規なアミノ酸配列であることが確認された。

また、抗 hIGF 抗体 KM1468 の VH および VL の CDR を、既知の抗体のアミノ酸配列と比較することにより同定した。KM1468 の VH の CDR1、2 および 3 のアミノ酸配列を配列番号 5、6 および 7 に、VL の CDR1、2 および 3 のアミノ酸配列を配列番号 8、9 および 10 にそれぞれ示した。

(2) ヒト型キメラ抗体発現ベクターの構築

W097/10354 に記載のヒト IgG1、 κ クラスの抗体を発現できるヒト化抗体発現ベクター pKANTEX93 と実施例 5 (1-3) で得られた KM1468 の H 鎖および L 鎖 cDNA を含むプラスミドを用いて抗 hIGF 抗体 KM1468 に由来する抗 hIGF-I キメラ抗体発現ベクターを以下のようにして構築した。

まず、KM1468 の VH および VLcDNA をアミノ酸配列が変化しないように発現ベクター pKANTEX93 に挿入するため、PCR によって KM1468 の VH および VLcDNA を再構築した。プライマーとして、VHcDNA 用に配列番号 11 と 12 の塩基配列をそれぞれ有する合成 DNA を、VLcDNA 用に配列番号 13 と 14 の塩基配列をそれぞれ有する合成 DNA を設計した。それぞれの合成 DNA は 5' 末端に pKANTEX93 ヘクローニングするための制限酵素認識配列を含んでいる。実際には、実施例 5 (1-3) で得られたプラスミド pKM1468H5-2 の 20ng を 50 μ L の KOD DNA Polymerase 添付 PCR Buffer #1 (東洋紡績社製)、0.2mM dNTPs、1mM 塩化マグネシウム、0.5 μ M の配列番号 11 と 12 に示した塩基配列を有する合成 DNA を含む緩衝液に添加し、DNA サーマルサイクラー GeneAmp PCR System 9600 (PERKIN ELMER 社製) を用いて、94°C にて 3 分間加熱した後、2.5 単位の KOD DNA Polymerase (東洋紡績社製) を添加し、98°C にて 15 秒間、65°C にて 2 秒間、74°C にて 30 秒間のサイクルを 25 サイクル行った。同様に、実施例 5 (1-3) で得られたプラスミド pKM1468L5-1 の 20ng を 50 μ L の KOD DNA Polymerase 添付 PCR Buffer #1 (東洋紡績社製)、0.2mM dNTPs、1mM 塩化マグネシウム、0.5 μ M の配列番号 13 と 14 に示した塩基配列を有する合成 DNA を含む緩衝液に添加し、上記と同様の方法で PCR を行なった。それぞれの反応液 10 μ L

をアガロースゲル電気泳動した後、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社製) を用いて、約 0.5kb の VH の PCR 産物、約 0.43kb の VL の PCR 産物をそれぞれ回収した。

次に、プラスミド pBluescript II SK(-) (Stratagene 社製) を制限酵素 Sma I (Takara Shuzo 社製) で消化後、Calf Intestine Alkaline Phosphatase (以下、CIAP と表記する ; Takara Shuzo 社製) で末端を脱リン酸化して得られた DNA 0.1 μ g と、上記で得られたそれぞれの PCR 産物約 0.1 μ g を滅菌水に加えて 7.5 μ L とし、TaKaRa DNA Ligation Kit Ver.2 の solution I (Takara Shuzo 社製) 7.5 μ L、制限酵素 Sma I (Takara Shuzo 社製) 0.3 μ L を加えて 22°C で一晩反応させた。このようにして得られた組換えプラスミド DNA 溶液を用いて大腸菌 DH5 α 株 (東洋紡績社製) を形質転換した。形質転換株より各プラスミド DNA を調製し、BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Applied Biosystems 社製) を用いて添付の説明書に従い、反応を行い、塩基配列自動分析装置 ABI PRISM 377 (Applied Biosystems 社製) を用いて塩基配列を決定した。こうして目的の塩基配列を有する第 1 3 図に示したプラスミド pKM1468VH および pKM1468VL を得た。

次に、上記で得られた pKM1468VH の VHcDNA を含む制限酵素断片 (NotI-ApaI) をヒト化抗体発現用ベクター pKANTEX93 の NotI-ApaI 部位に挿入し、第 1 4 図に示したプラスミド pKANTEX1468H を構築した。さらに、上記で得られた pKM1468VL の VLcDNA を含む制限酵素断片 (EcoRI-BsiWI) をプラスミド pKANTEX1468H の EcoRI-BsiWI 部位に挿入し、第 1 4 図に示したプラスミド pKANTEX1468Chi を構築した。プラスミド pKANTEX1468Chi を用いて、BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Applied Biosystems 社製) を用いて添付の説明書に従い、反応を行い、塩基配列自動分析装置 ABI PRISM 377 (Applied Biosystems 社製) を用いて VH および VLcDNA の塩基配列を決定した結果、目的の VH および VLcDNA がクローニングされたプラスミドが得られたことを確認した。

(3) 抗 hIGF キメラ抗体の動物細胞を用いた安定発現

実施例 5 (2-1) で得られた抗 hIGF キメラ抗体発現ベクター pKANTEX1468Chi を用いて抗 hIGF キメラ抗体の動物細胞での発現を以下のようにして行った。

プラスミド pKANTEX1468Chi を制限酵素 AatII (東洋紡績社製) で処理して直鎖状化した後、10 μ g を 4 \times 10⁶ 細胞のラットミエローマ細胞株 YB2/0 細胞 (ATCC CRL1581) ヘエレクトロポレーション法 (Cytotechnology, 3, 133-140, 1990) により導入後、40mL の H-SFM (5) 培地 [FCS を 5%含む H-SFM (Gibco BRL 社製)] に懸濁し、96 ウェル培養プレート (住友ベークライト社製) に 200 μ L/ウェルずつ分注した。37°C、5%CO₂ インキュベーター内で 24 時間培養した後、G418 を 0.5mg/mL になるように添加して 1~2 週間培養した。G418 耐性を示す形質転換株のコロニーが出現し、コンフルエントになったウェルより培養上清を回収し、上清中の抗 hIGF キメラ抗体の濃度を実施例 6 (1) に示す結合 ELISA により測定した。

培養上清中に抗 hIGF キメラ抗体の発現が認められたウェルの形質転換株については、dhfr 遺伝子増幅系を利用して抗体発現量を増加させる目的で、G418 を 0.5mg/mL、dhfr 遺伝子産物のジヒドロ葉酸還元酵素 (以下、DHFR と表記する) の阻害剤であるメソトレキセート (以下、MTX と表記する; SIGMA 社製) を 50nM 含む H-SFM(5)に 1~2 \times 10⁵ 細胞/mL になるように懸濁し、24 ウェル培養プレート

(Greiner 社製) に 1mL ずつ分注した。37°C、5%CO₂ インキュベーター内で 1~2 週間培養して、50nM MTX 耐性を示す形質転換株を誘導した。形質転換株がウェルにコンフルエントになった時点で培養上清中の抗 hIGF キメラ抗体の濃度を実施例 6

(1) に示す結合 ELISA により測定した。培養上清中に抗 hIGF キメラ抗体の発現が認められたウェルの形質転換株については、上記と同様の方法により、MTX 濃度を 100nM、200nM と順次上昇させ、最終的に G418 を 0.5mg/mL、MTX を 200nM の濃度で含む H-SFM(5)で増殖可能かつ、抗 hIGF キメラ抗体を高発現する形質転換株を得た。得られた形質転換株については、2 回の限界希釈法による単一細胞化を行い、抗 hIGF キメラ抗体の発現の最も高い形質転換細胞株を得た。KM1468 に由来する抗 hIGF キメラ抗体産生形質転換細胞株としては、KM3002 があげられる。なお、形質転換細胞株 KM3002 は、平成 14 年 4 月 2 日付けで独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6 郵便番号 305-8566) に FERM BP-7996 として寄託されている。

(4) 抗 hIGF キメラ抗体の培養上清からの精製

実施例 5 (3) で得られた抗 hIGF キメラ抗体を発現する形質転換細胞株 KM3002 を、G418 を 0.5mg/mL、MTX を 200nM、Daigo's GF21 (和光純薬社製) を 5% の濃度で含む H-SFM に $1 \sim 2 \times 10^5$ 細胞/mL となるように懸濁し、175cm² フラスコ (Greiner 社製) に 100mL ずつ分注した。37°C、5%CO₂ インキュベーター内で 5~7 日間培養し、コンフルエントになった時点で培養上清を回収した。培養上清約 1L より Prosep-A (Bioprocessing 社製) カラムを用いて、添付の説明書に従い、抗 hIGF キメラ抗体 KM3002 を精製し、約 10.2mg の精製蛋白質を取得した。得られた抗 hIGF キメラ抗体 KM3002 の約 4 μ g を、公知の方法 (Nature, 227, 680-685, 1970) に従って電気泳動し、分子量および精製度を調べた。その結果を第 15 図に示した。精製した抗 hIGF キメラ抗体 KM3002 は、非還元条件下では分子量が約 150 キロダルトン (以下、Kd と表記する) の 1 本のバンドが、還元条件下では約 50Kd と約 25Kd の 2 本のバンドが認められた。これらの分子量は、IgG クラスの抗体は、非還元条件下では分子量は約 150Kd であり、還元条件下では分子内の S-S 結合が切断され、約 50Kd の分子量を持つ H 鎖と約 25Kd の分子量を持つ L 鎖に分解されるという報告 (Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14, 1988; Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press Limited, 1996) と一致し、抗 hIGF キメラ抗体 KM3002 が正しい構造の抗体分子として発現されていることが確認された。また、精製した抗 hIGF キメラ抗体 KM3002 の H 鎖および L 鎖の N 末端アミノ酸配列をプロテインシーケンサー PPSQ-10 (Shimadzu 社製) を用いて解析した結果、抗 hIGF 抗体 KM1468 の H 鎖および L 鎖の N 末端アミノ酸配列と一致することを確認した。

実施例 6 抗 hIGF キメラ抗体 KM3002 の反応性の検討

(1) 抗 hIGF キメラ抗体 KM3002 の hIGF に対する反応性

抗 hIGF ラット抗体 KM1468 および実施例 5 (2-3) で精製した抗 hIGF キメラ抗体 KM3002 の hIGF-I に対する反応性を実施例 1 (4) に示した ELISA により検討した。ただし、ELISA プレートに固定化したメチル化 BSA-hIGF-I の濃度は、0.5 μ g/mL、二次抗体として、ラット抗体の場合は、4000 倍に希釈したペルオキシダー

ゼ標識ウサギ抗ラット Ig 抗体 (DAKO 社製)、キメラ抗体の場合は、1000 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識マウス抗ヒト IgG1 抗体 (Southern Biotechnology 社製) を用いて行った。第 16 図に示したように、抗 hIGF キメラ抗体 KM3002 は、hIGF-I に対する抗体濃度依存的な結合活性を示した。また、その活性は、二次抗体が異なるため、直接の比較は困難であるが、抗 hIGF ラット抗体 KM1468 と同等であることが示唆された。

(2) 抗 hIGF キメラ抗体 KM3002 の hIGF 依存性細胞増殖に対する影響

抗 hIGF ラット抗体 KM1468、実施例 5 (2-3) で精製した抗 hIGF キメラ抗体 KM3002、市販の抗 hIGF-I 抗体である sm1.2 (Upstate biotechnology 社製) および市販の抗 hIGF-II 抗体である S1F2 (Upstate biotechnology 社製) の hIGF 依存性細胞増殖に対する影響を実施例 3 (4) と同様の方法により検討した。ヒト癌細胞株としては、大腸癌細胞株 HT-29 (ATCC HTB-38) を用いた。

第 17 図 A には、2ng/mL の hIGF-I 存在下、第 17 図 B には、10ng/mL の hIGF-II の存在下での、各抗体添加時の増殖を示した。第 17 図に示したように、KM3002 は、KM1468 と同様、hIGF-I および hIGF-II による細胞増殖を強く阻害し、その活性は、市販の抗 hIGF-I 抗体である sm1.2 および市販の抗 hIGF-II 抗体である S1F2 よりも高かった。また、キメラ抗体である KM3002 と同一の可変領域を有する抗 hIGF 抗体 KM1468 は、同等の増殖阻害活性を示した。以上の結果は、KM1468 に由来する抗 hIGF キメラ抗体 KM3002 は、キメラ化後も元のラット抗体 KM1468 と同等の抗原結合活性および抗原結合特異性を保持していることを示している。

実施例 7 抗 hIGF CDR 移植抗体の作製

(1) 抗 hIGF CDR 移植抗体の VH および VL をコードする cDNA の構築

(1-1) 抗 hIGF CDR 移植抗体の VH および VL のアミノ酸配列の設計

まず、抗 hIGF CDR 移植抗体の VH のアミノ酸配列を以下のようにして設計した。実施例 5 (1-4) で同定した抗 hIGF 抗体 KM1468 の VH の CDR のアミノ酸配列を移植するためのヒト抗体の VH の FR のアミノ酸配列を選択した。公的データベースより、抗 hIGF 抗体 KM1468 の VH の FR と最も高い相同性を有するヒト抗体の FR を検

索した結果、CAM (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 77, 3239-3243, 1980) が最も高い相同性 (81.6%) を有していた。そこで、CAM のFR を基に抗 hIGF CDR 移植抗体の VH を設計した。CAM のFR には、アミノ酸配列が一義的に決定されていない箇所が 4 箇所 (13 番目、74 番目、77 番目、90 番目) 存在し、また、ヒト抗体の配列において、一般的でないアミノ酸残基が、3 番目と 40 番目に認められた。そこで、これらのアミノ酸残基については、免疫原性をより低下させるため、ヒト抗体で高い頻度で認められるアミノ酸残基 (Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991) へ改変した。このようにして設計した CAM 由来のFR のアミノ酸配列の適切な位置に抗 hIGF 抗体 KM1468 の VH の CDR のアミノ酸配列を移植し、配列番号 15 に記載の抗 hIGF CDR 移植抗体の VH のアミノ酸配列 HV.0 を設計した。

次に、抗 hIGF CDR 移植抗体の VL のアミノ酸配列を以下のようにして設計した。実施例 5 (1-4) で同定した抗 hIGF 抗体 KM1468 の VL の CDR のアミノ酸配列を移植するためのヒト抗体の VL のFR のアミノ酸配列を選択した。カバットらは、既知の様々なヒト抗体の VL をそのアミノ酸配列の相同性から 4 種類のサブグループ (HSG I~IV) に分類し、さらに、それら各サブグループ毎に共通配列を報告している (Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991)。それら共通配列は、ヒトにおいてより免疫原性が低下する可能性が考えられることから、それら共通配列を基に抗 hIGF CDR 移植抗体の VL のアミノ酸配列を設計することとした。より活性の高い抗 hIGF CDR 移植抗体を作製するために、設計にあたってはヒト抗体の VL の 4 種類のサブグループの共通配列のFR のアミノ酸配列のうち、KM1468 の VL のFR のアミノ酸配列と最も高い相同性を有するFR のアミノ酸配列を選択した。第 2 表には、相同性の検索結果を示した。第 2 表に示したように、KM1468 の VL 領域のFR のアミノ酸配列はサブグループ IV と最も高い相同性を有していた。

第2表

HSGI	HSGII	HSGIII	HSGIV
66.3%	61.3%	66.3%	67.5%

以上の結果から、ヒト抗体のVLのサブグループIVの共通配列のFRのアミノ酸配列の適切な位置に抗hIGF抗体KM1468のVLのCDRのアミノ酸配列を移植し、配列番号16に記載の抗hIGF CDR移植抗体のVLのアミノ酸配列LV.0を設計した。

上記で設計した抗hIGF CDR移植抗体のVHのアミノ酸配列HV.0およびVLのアミノ酸配列LV.0は、選択したヒト抗体のFRのアミノ酸配列に抗hIGF抗体KM1468のCDRのアミノ酸配列のみを移植した配列であるが、一般に、ヒト型CDR移植抗体では、ヒト以外の動物の抗体のCDRのアミノ酸配列の移植のみでは活性が低下してしまうことが多く、それを回避するため、ヒト抗体とヒト以外の動物の抗体で異なっているFRのアミノ酸残基のうち、活性に影響を与えられとされるアミノ酸残基をCDRのアミノ酸配列とともに移植することが行われている。そこで、本実施例においても、活性に影響を与えられとされるFRのアミノ酸残基を同定することを検討した。まず、上記で設計した抗hIGF CDR移植抗体のVHのアミノ酸配列HV.0およびVLのアミノ酸配列LV.0よりなる抗体V領域(HVOLV0)の三次元構造をコンピューターモデリングの手法を用いて構築した。三次元構造座標作製に関してはソフトウェアAbM (Oxford Molecular社製)を、三次元構造の表示についてはソフトウェアPro-Explore (Oxford Molecular社製)あるいはRasMol(Glaxo社製)を用いてそれぞれ添付の使用説明書に従い、行った。また、抗hIGF抗体KM1468のV領域の三次元構造のコンピューターモデルも同様にして構築した。更に、HVOLV0のVHおよびVLのFRのアミノ酸配列において、抗hIGF抗体KM1468と異なっている残基について順次、抗hIGF抗体KM1468の相当する位置に見られる残基へ改変したアミノ酸配列からなる三次元構造モデルを同様にして構築し、抗hIGF抗体KM1468、HVOLV0および改変体のV領域の三次元構造を比較した。その結果、HVOLV0のFRのアミノ酸残基の中で抗原結合部位の三次元構造を変化させ、抗体の活性に影響を与えられとされる残基として、HV.0では1番目のGln、77番目のAsn、84番目の

Asn、93 番目の Val、97 番目の Ala、98 番目の Arg を、LV.0 では 1 番目の Asp、9 番目の Asp、10 番目の Ser、11 番目の Leu、22 番目の Asn、35 番目の Tyr、39 番目の Pro、42 番目の Pro、45 番目の Leu、46 番目の Leu、69 番目の Asp、70 番目の Phe、71 番目の Thr、82 番目の Val、84 番目の Val を選択した。これらの選択したアミノ酸残基のうち、少なくとも 1 つ以上をラット抗体 KM1468 に見られるアミノ残基へ改変し、様々な改変を有するヒト型 CDR 移植抗体の VH および VL を設計した。

(1-2) 抗 hIGF CDR 移植抗体の VH をコードする cDNA の構築

実施例 6 (1-1) で設計した抗 hIGF CDR 移植抗体の VH のアミノ酸配列 HV.0 をコードする cDNA を PCR を用いて以下のようにして構築した。

まず、設計したアミノ酸配列に配列番号 2 に記載の抗 hIGF 抗体 KM1468 の H 鎖の分泌シグナル配列を繋げて完全な抗体アミノ酸配列とした。次に、該アミノ酸配列を遺伝子コドンに変換した。1 つのアミノ酸残基に対して複数の遺伝子コドンが存在する場合は、抗体の遺伝子の塩基配列に見られる使用頻度 (Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991) を考慮し、対応する遺伝子コドンを選定した。決定した遺伝子コドンを繋げて、完全な抗体 V 領域のアミノ酸配列をコードする cDNA の塩基配列を設計し、更に 5' 末端と 3' 末端に PCR 反応時の増幅用プライマーの結合塩基配列 (ヒト化抗体発現用ベクターへクローニングするための制限酵素認識配列も含む) を付加した。設計した塩基配列を 5' 末端側から約 100 塩基ずつ計 6 本の塩基配列に分け (隣合う塩基配列は、その末端に約 20 塩基の重複配列を有するようにする)、それらをセンス鎖、アンチセンス鎖の交互の順で、合成オリゴヌクレオチドを合成した (GENSET 社製)。

各オリゴヌクレオチドを最終濃度が $0.1\mu\text{M}$ となるように $50\mu\text{L}$ の反応液に加えて、 $0.5\mu\text{M}$ M13 primer RV (Takara Shuzo 社製)、 $0.5\mu\text{M}$ M13 primer M4

(Takara Shuzo 社製) および 1 単位の KOD polymerase (東洋紡績社製) を用いて、KOD polymerase に添付の使用説明書に従い、PCR を行った。この際の反応条件は使用説明書に記された条件 (94°C 30 秒間、 50°C 30 秒間、 74°C 60 秒間のサイクルを 30 サイクル) に従った。該反応液をエタノール沈殿した後、滅菌水に溶解し、

適当な制限酵素処理を行った後に、プラスミド pBluescript II SK(-)

(Stratagene 社製) に連結した。このようにして得られた組換えプラスミド DNA 溶液を用いて大腸菌 DH5 α 株を形質転換し、形質転換株の株よりプラスミド DNA を調製し、BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Applied Biosystems 社製) を用いて塩基配列を解析した結果、目的の塩基配列を有するプラスミドを得た。

次に、実施例 6 (1-1) で設計した FR のアミノ酸残基の改変は、変異を有する合成オリゴヌクレオチドを作製し、上記の PCR を行うか、上記で作製した HV.0 をコードする cDNA を含むプラスミド DNA を鋳型として変異を有する合成 DNA をプライマーとして PCR を行い、増幅断片を単離することで達成した。改変後のアミノ酸残基の遺伝子コドンについては、ラット抗体 KM1468 で見られる遺伝子コドンとなるように行った。

(1-3) 抗 hIGF CDR 移植抗体の VL をコードする cDNA の構築

実施例 6 (1-1) で設計した抗 hIGF CDR 移植抗体の VH のアミノ酸配列 LV.0 をコードする cDNA を PCR を用いて以下のようにして構築した。

まず、設計したアミノ酸配列に配列番号 4 に記載の抗 hIGF 抗体 KM1468 の L 鎖の分泌シグナル配列を繋げて完全な抗体アミノ酸配列とした。次に、該アミノ酸配列を遺伝子コドンに変換した。1つのアミノ酸残基に対して複数の遺伝子コドンが存在する場合は、抗体の遺伝子の塩基配列に見られる使用頻度 (Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991) を考慮し、対応する遺伝子コドンを決めた。決定した遺伝子コドンを繋げて、完全な抗体 V 領域のアミノ酸配列をコードする cDNA の塩基配列を設計し、更に 5' 末端と 3' 末端に PCR 反応時の増幅用プライマーの結合塩基配列 (ヒト化抗体発現用ベクターへクローニングするための制限酵素認識配列も含む) を付加した。設計した塩基配列を 5' 末端側から約 100 塩基ずつ計 6 本の塩基配列に分け (隣合う塩基配列は、その末端に約 20 塩基の重複配列を有するようにする)、それらをセンス鎖、アンチセンス鎖の交互の順で、合成オリゴヌクレオチドを合成した (GENSET 社製)。

各オリゴヌクレオチドを最終濃度が $0.1\mu\text{M}$ となるように $50\mu\text{L}$ の反応液に加えて、 $0.5\mu\text{M}$ M13 primer RV (Takara Shuzo 社製)、 $0.5\mu\text{M}$ M13 primer M4 (Takara Shuzo 社製) および 1 単位の KOD polymerase (東洋紡績社製) を用いて、KOD polymerase に添付の使用説明書に従い、PCR を行った。この際の反応条件は使用説明書に記された条件 (94°C 30 秒間、 50°C 30 秒間、 74°C 60 秒間のサイクルを 30 サイクル) に従った。該反応液をエタノール沈殿した後、滅菌水に溶解し、適当な制限酵素処理を行った後に、プラスミド pBluescript II SK(-) (Stratagene 社製) に連結した。このようにして得られた組換えプラスミド DNA 溶液を用いて大腸菌 DH5 α 株を形質転換し、形質転換株よりプラスミド DNA を調製し、BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Applied Biosystems 社製) を用いて塩基配列を解析した結果、目的の塩基配列を有するプラスミドを得た。

次に、実施例 6 (1-1) で設計した FR のアミノ酸残基の改変は、変異を有する合成オリゴヌクレオチドを作製し、上記の PCR を行うか、上記で作製した LV.0 をコードする cDNA を含むプラスミド DNA を鋳型として変異を有する合成 DNA をプライマーとして PCR を行い、増幅断片を単離することで達成した。改変後のアミノ酸残基の遺伝子コドンについては、抗 hIGF 抗体 KM1468 で見られる遺伝子コドンとなるように行った。

(2) 抗 hIGF CDR 移植抗体発現ベクターの構築

W097/10354 に記載のヒト化抗体発現用ベクター pKANTEX93 の適当な位置に実施例 6 (1-2) および実施例 (1-3) で得られた HV.0 および LV.0 をコードする cDNA およびそれらの改変体をコードする cDNA を挿入し、各種抗 hIGF CDR 移植抗体発現ベクターを構築した。

(3) 抗 hIGF CDR 移植抗体の動物細胞を用いた安定発現

抗 hIGF CDR 移植抗体の動物細胞を用いた安定発現および培養上清からの抗体の精製は、上記実施例 5 (3) に記載の方法に従い行った。

産業上の利用可能性

本発明は、ヒト IGF-I およびヒト IGF-II に特異的に結合し、ヒト IGF-I およびヒト IGF-II の機能を阻害する能力を有し、かつ、バイオセンサーピアコアで測定される結合定数が $5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 以上の結合活性を有する抗体を提供することを目的とする。さらに、本発明は、該抗体を用いるヒト IGF 介在性疾患または異常なヒト IGF の産生亢進により病態が進行する疾患の診断薬、予防薬および治療薬を提供することを目的とする。

請求の範囲

1. ヒト IGF-I および ヒト IGF-II に特異的に結合し、ヒト IGF-I および ヒト IGF-II の機能を阻害する能力を有し、かつ、バイオセンサーバイオコアで測定される結合定数が $5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 以上の結合活性を有する抗体またはその抗体断片。
2. ヒト IGF-I に対する結合活性とヒト IGF-II に対する結合活性とが同程度である請求の範囲第 1 項に記載の抗体またはその抗体断片。
3. 抗体またはその抗体断片の重鎖可変領域 (VH) の CDR1、CDR2 および CDR3 が、それぞれ配列番号 5、6 および 7、および／または軽鎖可変領域 (VL) の CDR1、CDR2 および CDR3 が、それぞれ配列番号 8、9 および 10 で示されるアミノ酸配列を含む、請求の範囲第 1 項または第 2 項に記載の抗体またはその抗体断片。
4. 抗体が、ヒト以外の動物の抗体または遺伝子組換え抗体である、請求の範囲第 1～3 項のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗体断片。
5. 遺伝子組換え抗体が、ヒト型キメラ抗体、ヒト型 CDR 移植抗体およびヒト抗体からなる群から選ばれる、請求の範囲第 4 項に記載の抗体またはその抗体断片。
6. ヒト以外の動物の抗体の VH が配列番号 2、および／または VL が配列番号 4 で示されるアミノ酸配列を含む、請求の範囲第 4 項に記載の抗体またはその抗体断片。
7. ヒト以外の動物の抗体が、ハイブリドーマ KM1468 (FERM BP-7978) により生産される請求の範囲第 3 項または第 6 項に記載の抗体またはその抗体断片。
8. ヒト型キメラ抗体の VH が配列番号 2、および／または VL が配列番号 4 で示されるアミノ酸配列を含む、請求の範囲第 5 項に記載の抗体またはその抗体断片。
9. ヒト型キメラ抗体が、KM1468 (FERM BP-7978) より生産される抗体の VH および／または VL を含む、請求の範囲第 5 項または第 8 項に記載の抗体またはその抗体断片。
10. ヒト型キメラ抗体が、ヒト抗体の定常領域を含む、請求の範囲第 5 項、8 および 9 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗体断片。
11. ヒト抗体の定常領域が、ヒト抗体 IgG1 クラスおよび／または κ クラスの

定常領域からなる請求の範囲第10項に記載の抗体またはその抗体断片。

12. ヒト型キメラ抗体が、形質転換株KM3002 (FERM BP-7996) により生産される請求の範囲第5項、第8項～第11項のいずれか1項に記載の抗体またはその抗体断片。

13. ヒト型CDR移植抗体のVHのCDR1、CDR2およびCDR3が、それぞれ配列番号5、6および7、および／またはVLのCDR1、CDR2およびCDR3が、それぞれ配列番号8、9および10で示されるアミノ酸配列を含む、請求の範囲第4項に記載の抗体またはその抗体断片。

14. ヒト型CDR移植抗体が、KM1468 (FERM BP-7978) により生産される抗体のVHのCDRおよび／またはKM1468 (FERM BP-7978) により生産される抗体のVLのCDRを含む、請求の範囲第5項または第13項に記載の抗体またはその抗体断片。

15. ヒト型CDR移植抗体が、ヒト抗体の定常領域を含む、請求の範囲第4項、第13項および第14項のいずれか1項に記載の抗体またはその抗体断片。

16. ヒト抗体の定常領域が、ヒト抗体IgG1クラスおよび／またはκクラスの定常領域からなる請求の範囲第15項に記載の抗体またはその抗体断片。

17. 抗体断片が、Fab、Fab'、F(ab')₂、一本鎖抗体 (scFv)、二量体化V領域 (Diabody)、ジスルフィド安定化V領域 (dsFv) およびCDRを含むペプチドから選ばれる抗体断片である請求の範囲第1項～第16項のいずれか1項に記載の抗体断片。

18. 請求の範囲第1項～第17項のいずれか1項に記載の抗体またはその抗体断片をコードするDNA。

19. 請求の範囲第18項に記載のDNAを含有する組換えベクター。

20. 請求の範囲第19項に記載の組換えベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換株。

21. 請求の範囲第20項に記載の形質転換株を培地に培養し、培養物中に請求の範囲第1項～第16項のいずれか1項に記載の抗体またはその抗体断片を生成蓄積させ、培養物から抗体またはその抗体断片を採取することを特徴とする抗体またはその抗体断片の製造方法。

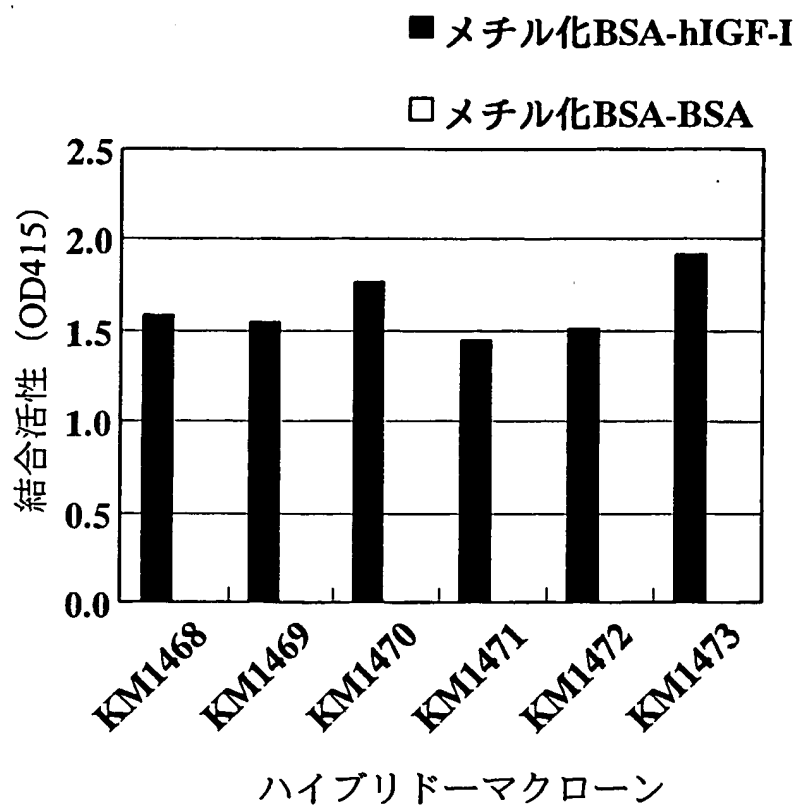
22. 請求の範囲第1項～第17項のいずれか1項に記載の抗体およびその抗体断

片から選ばれる少なくとも1種を有効成分として含有する医薬。

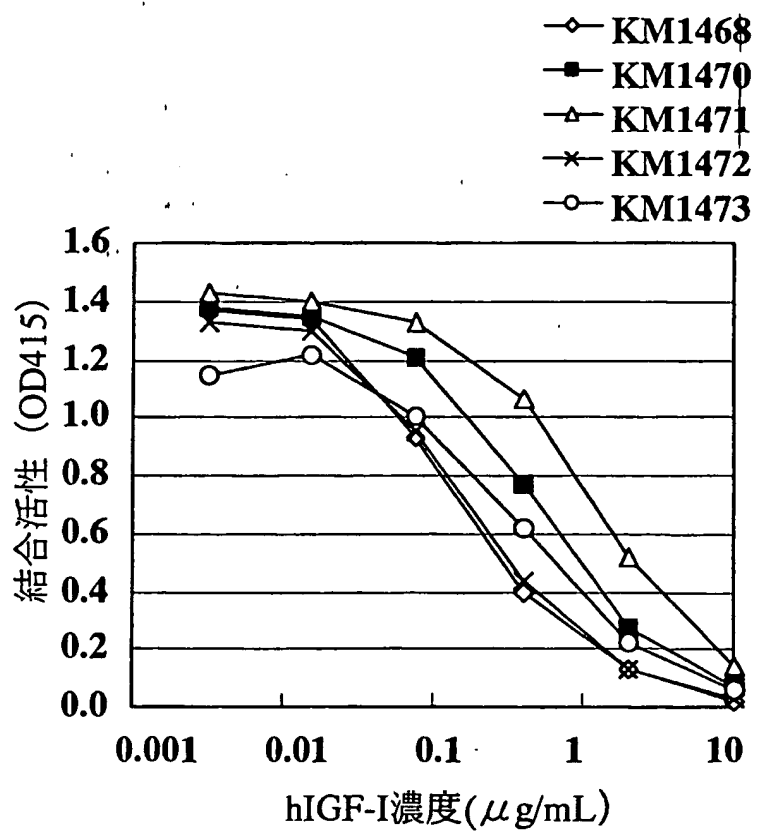
23. 請求の範囲第1項～第17項のいずれか1項に記載の抗体およびその抗体断片から選ばれる少なくとも1種を有効成分として含有するヒトIGF介在性疾患または異常なヒトIGFの産生亢進により病態が進行する疾患の治療薬。

24. 請求の範囲第1項～第17項のいずれか1項に記載の抗体およびその抗体断片から選ばれる少なくとも1種を含有するヒトIGF介在性疾患または異常なヒトIGFの産生亢進により病態が進行する疾患の診断薬。

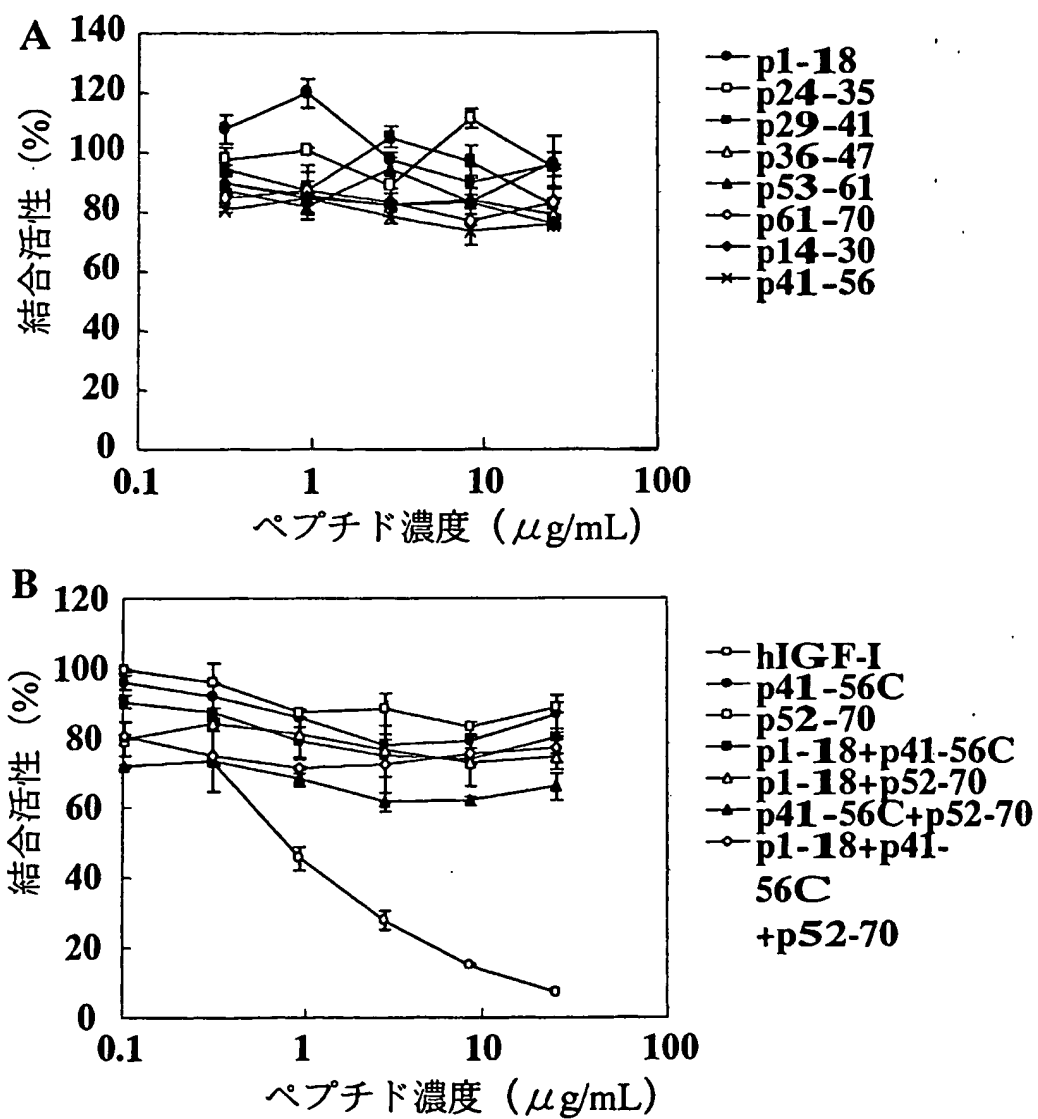
第1図



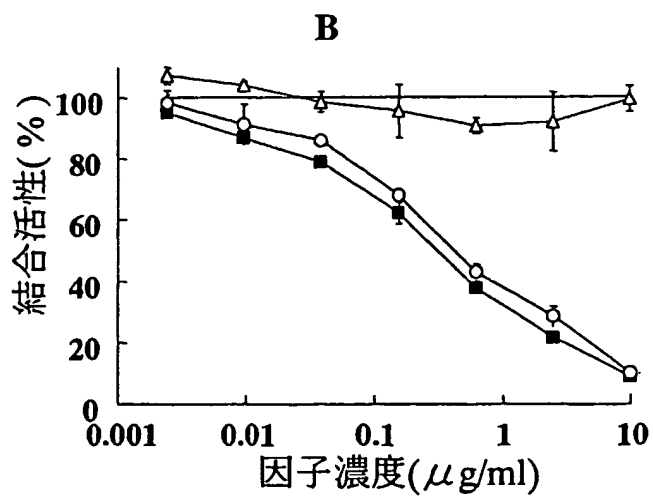
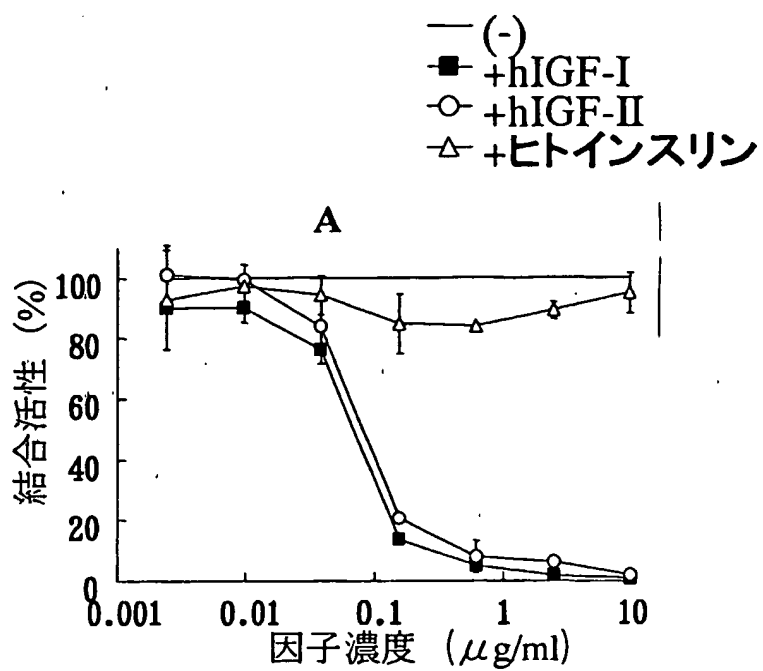
第2図



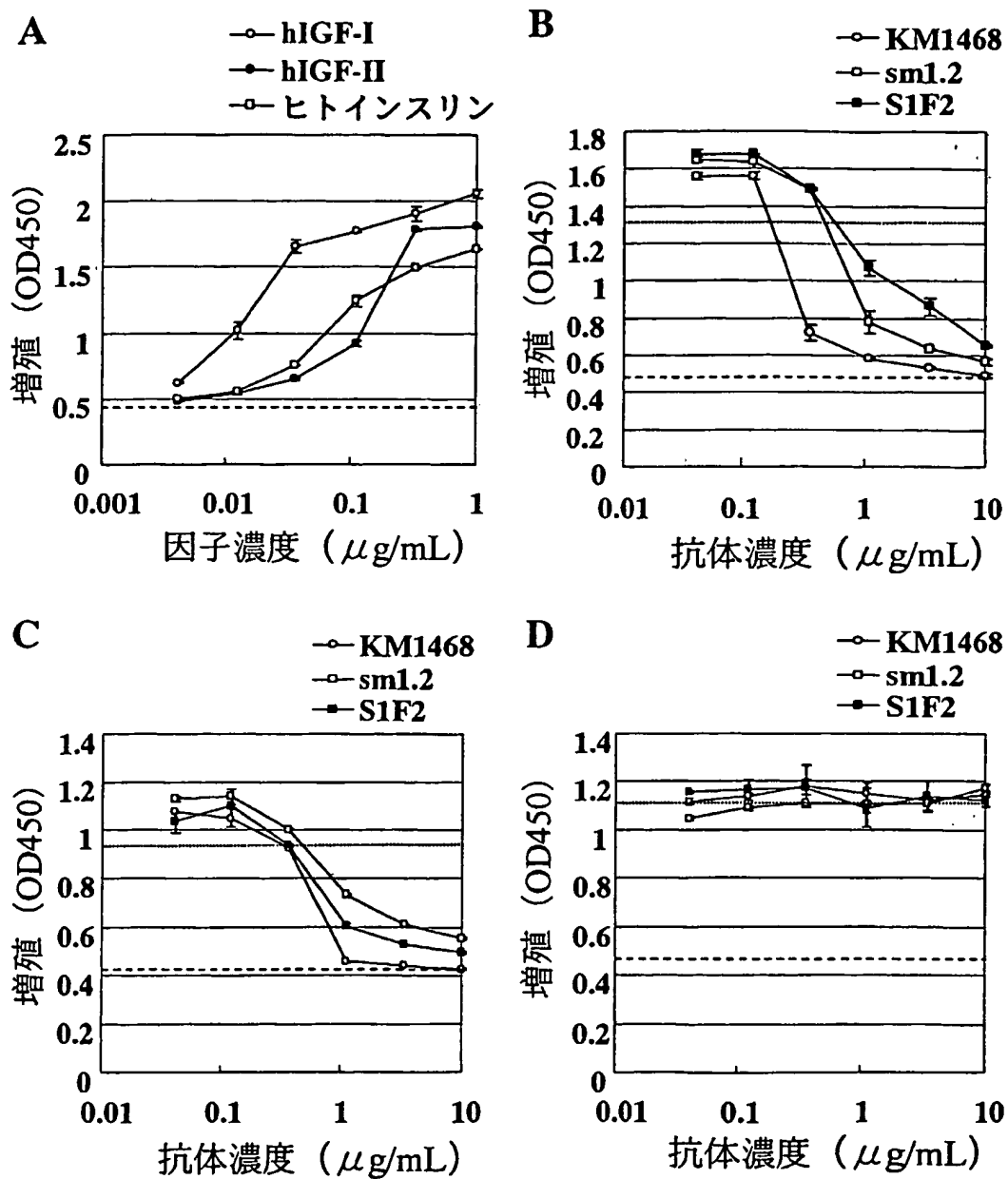
第3図



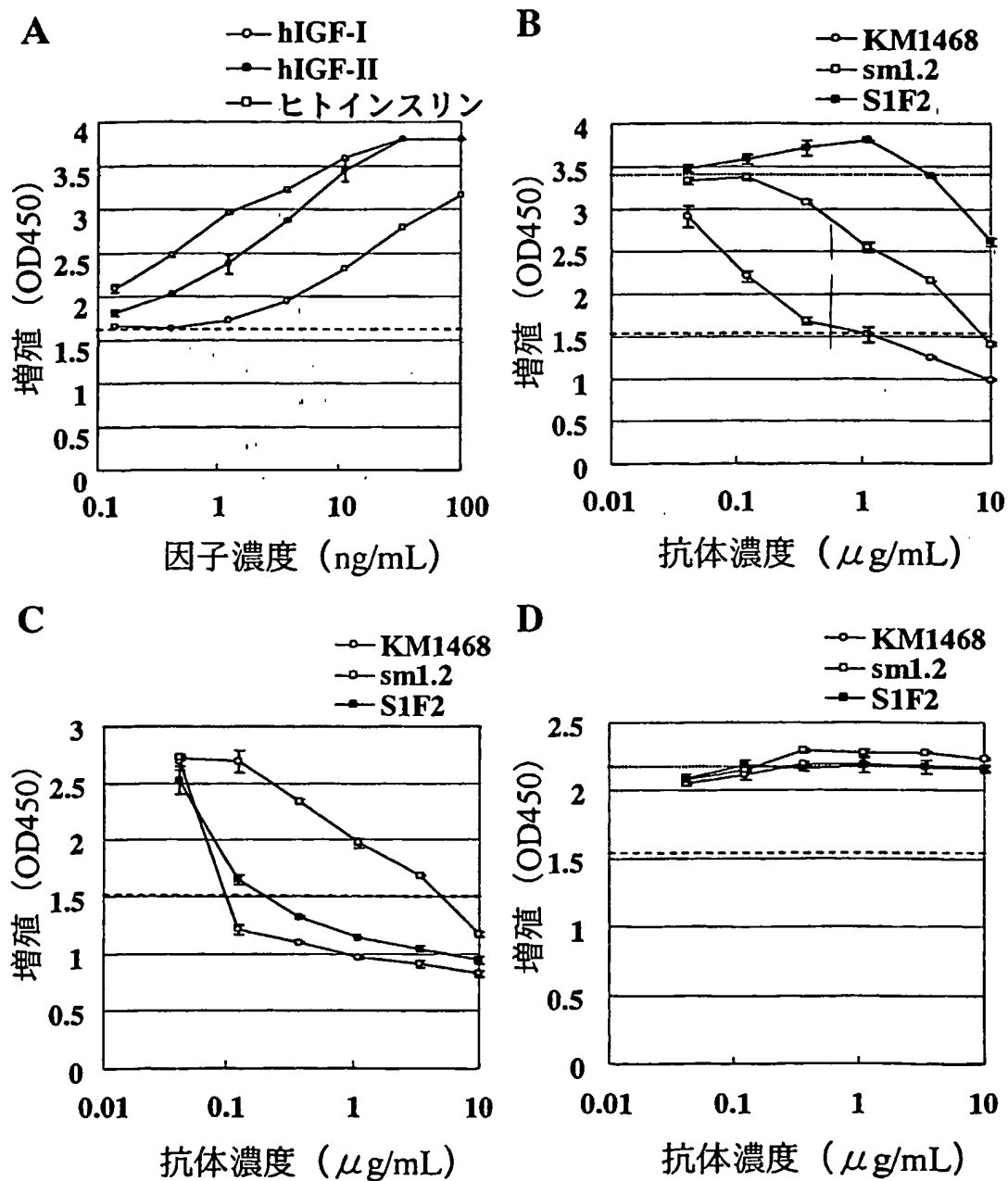
第4図



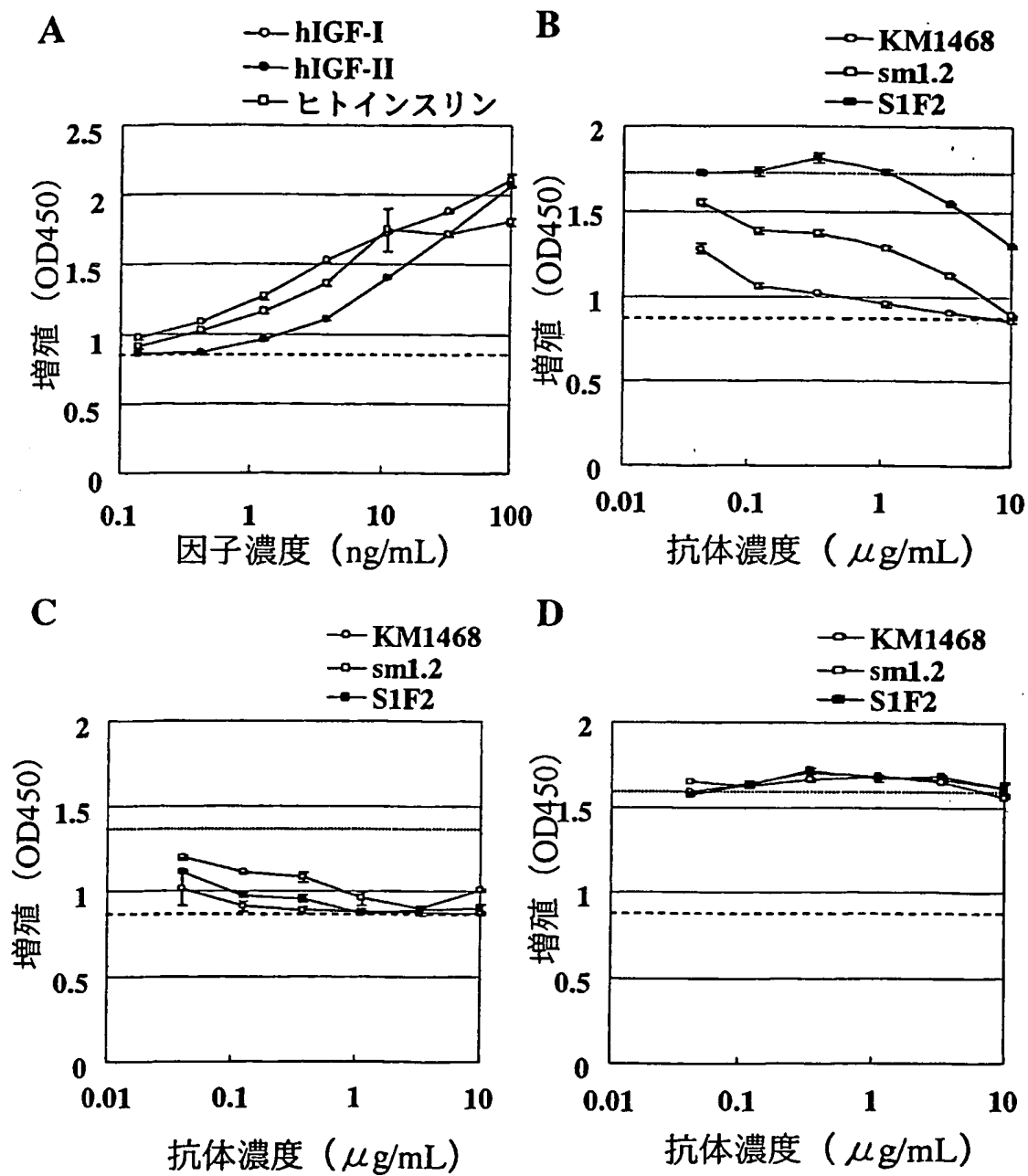
第5図



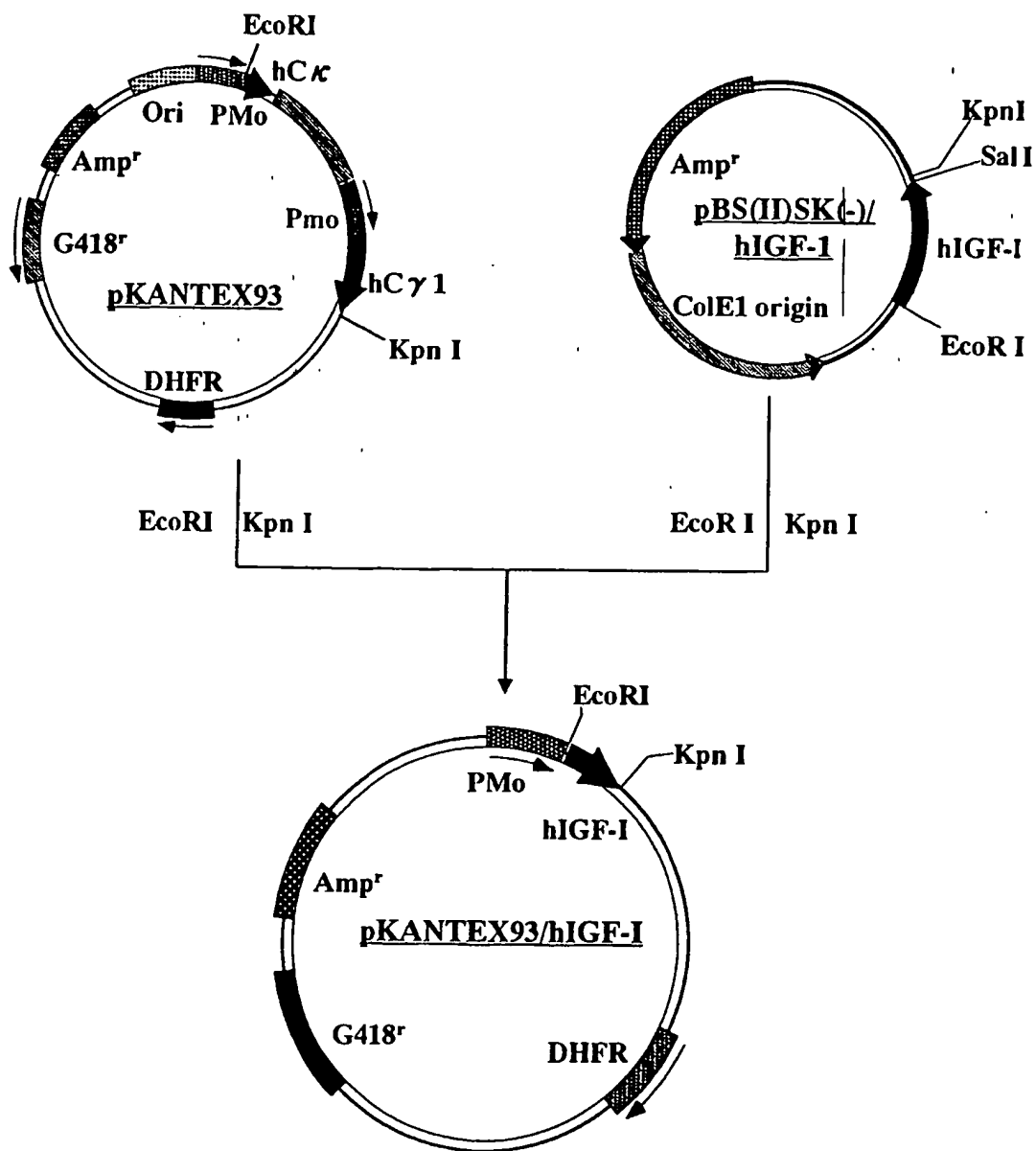
第6図



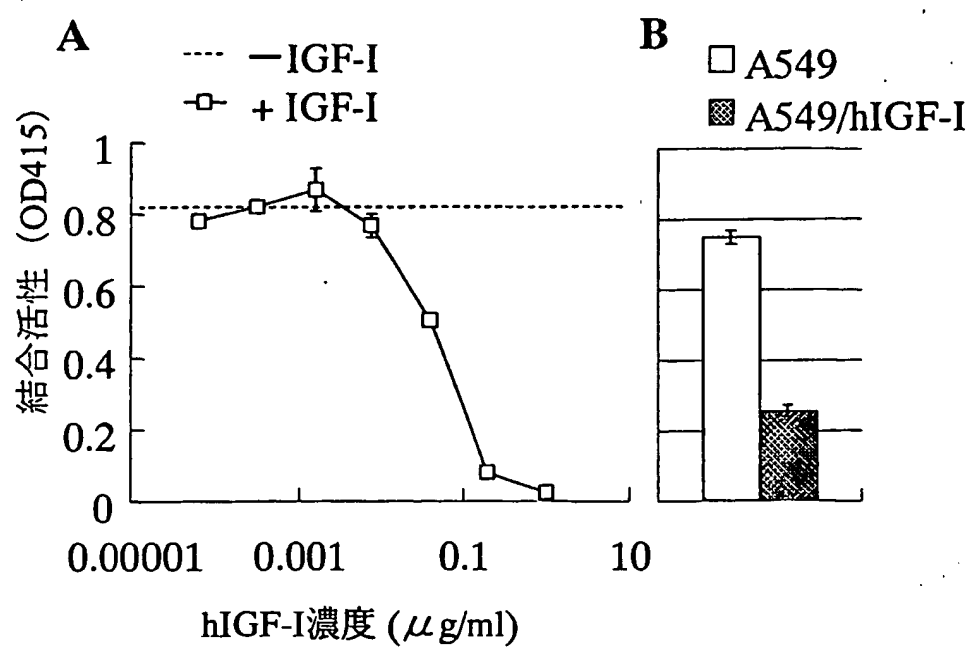
第7図



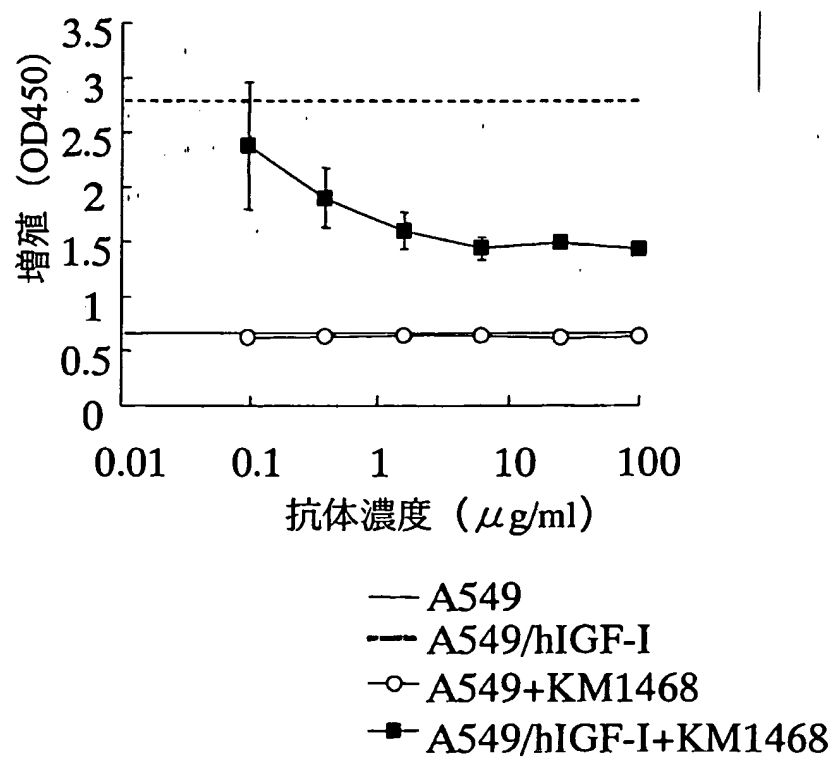
第 8 図



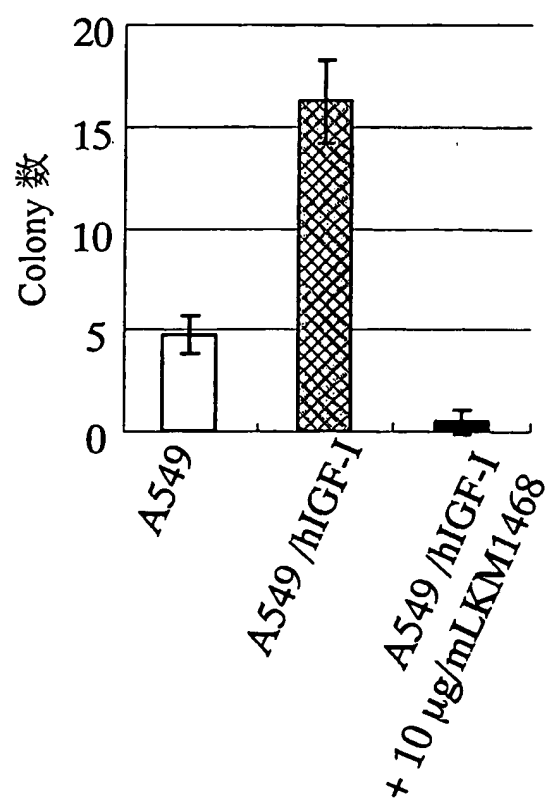
第9図



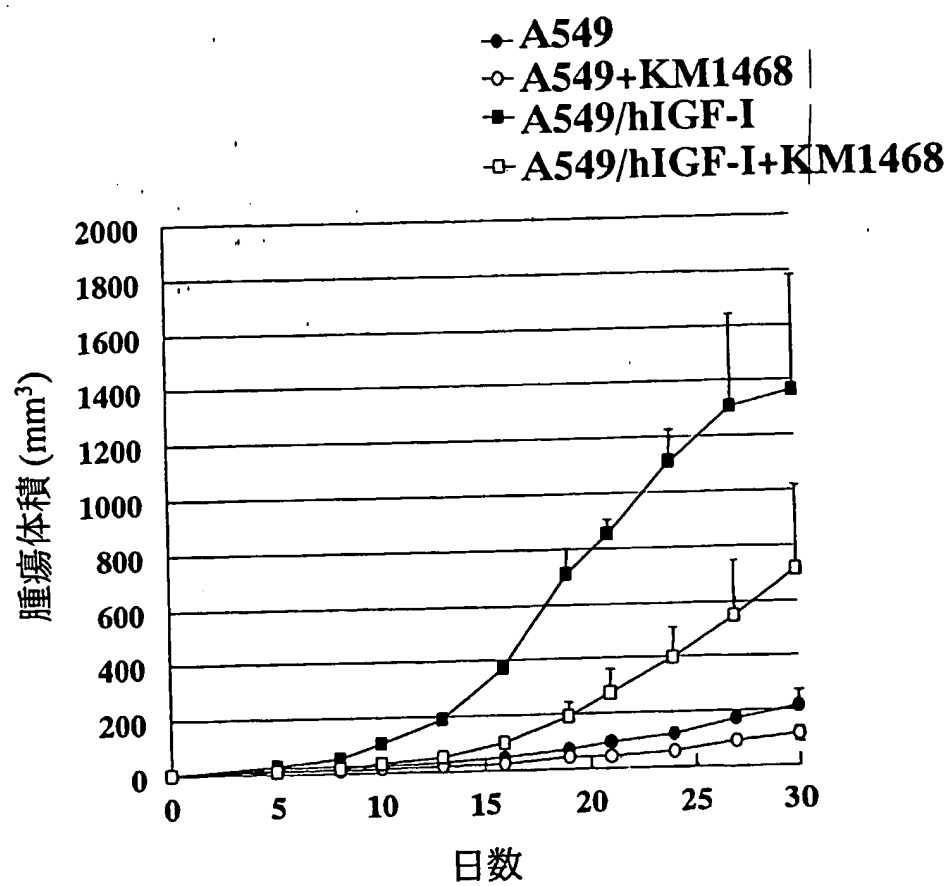
第 10 図



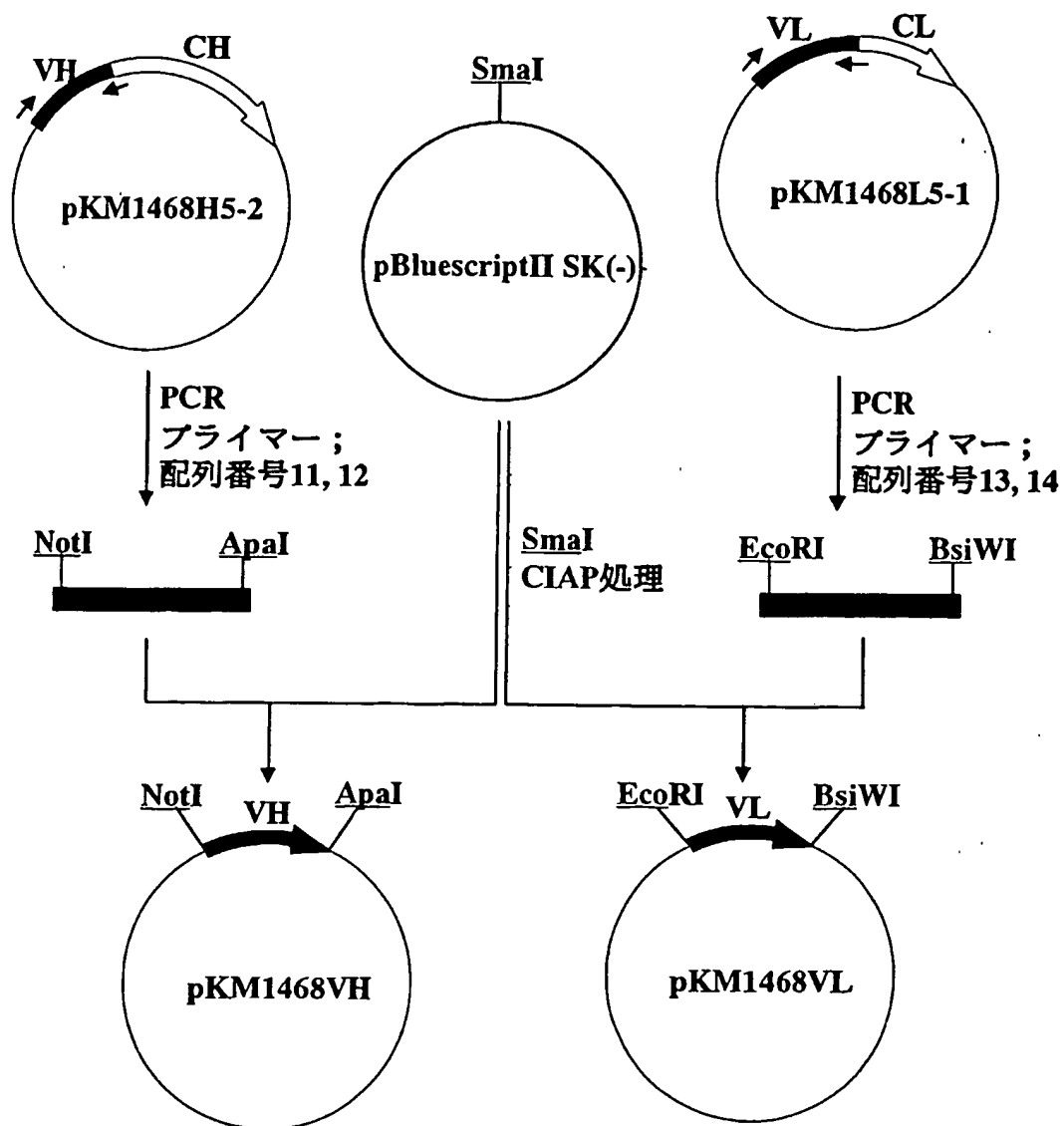
第 1 1 図



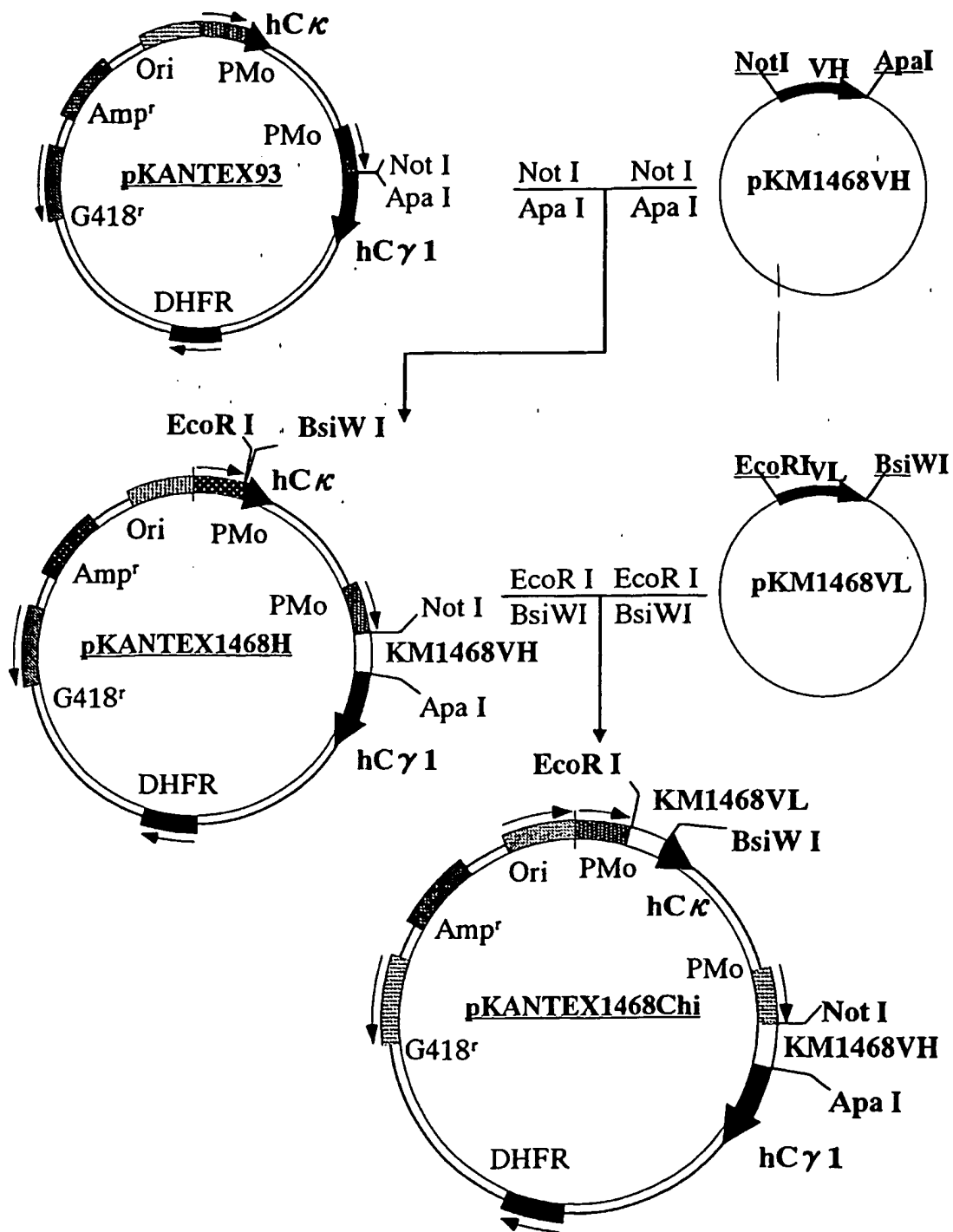
第 1 2 図



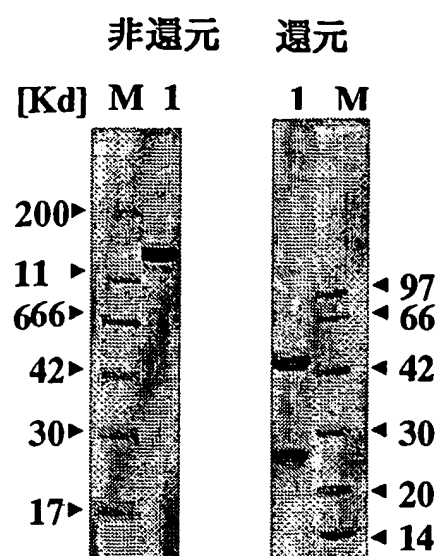
第 1 3 図



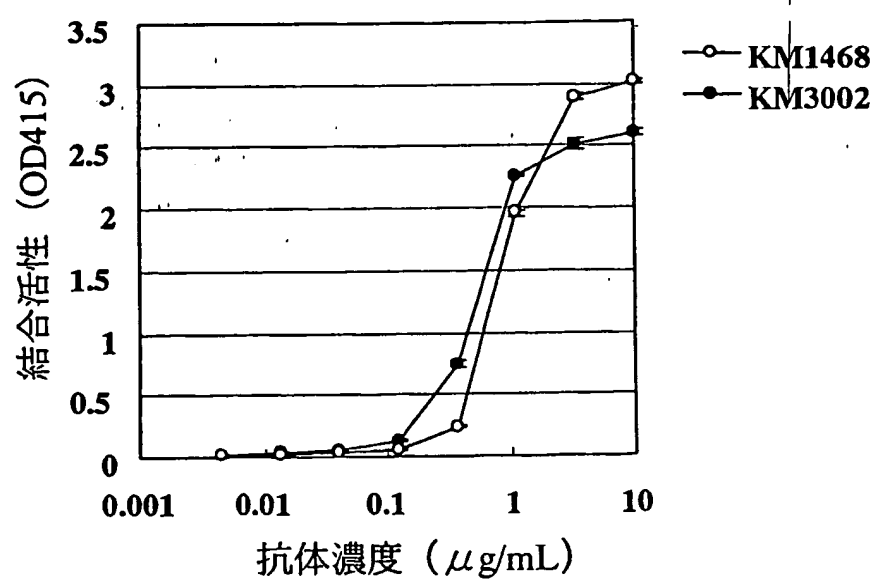
第 1 4 図



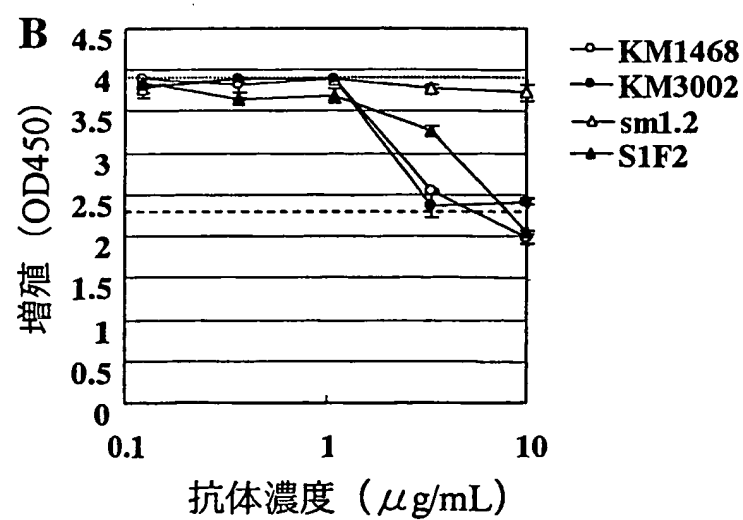
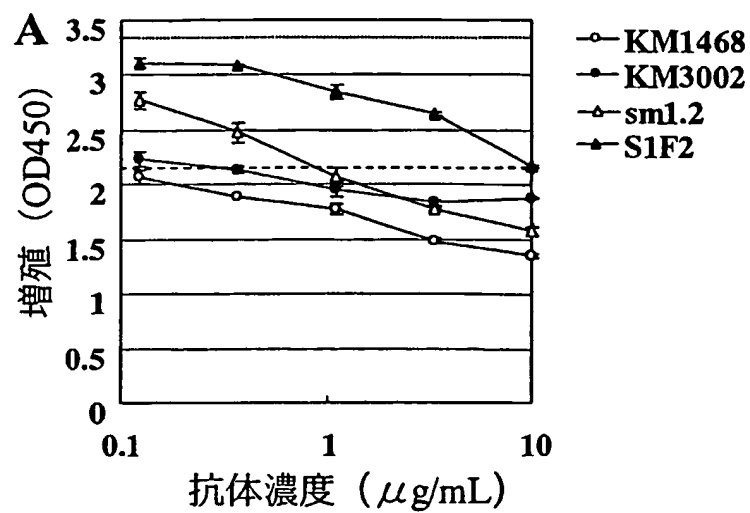
第 15 図



第 16 図



第 17 図



SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

<120> The antibody against human insulin like growth factor

<130> 11482W01

<150> JP2002-129046

<151> 2002-04-30

<160> 28

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 411

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(411)

<400> 1

atg gac atc agg ctc agc ttg gtt ttc ctt gtc ctt ttc ata aaa ggt	48
Met Asp Ile Arg Leu Ser Leu Val Phe Leu Val Leu Phe Ile Lys Gly	
1 5 10 15	

gtc cag tgt gag gta cac ctg gtg gaa tct ggg gga ggc tta gtg cag	96
Val Gln Cys Glu Val His Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln	
20 25 30	

cct gga agg tcc ctg aaa ctc tcc tgt gca gcc tca gga ttc act ttc	144
Pro Gly Arg Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe	
35 40 45	

agt aac tat tac atg acc tgg gtc cgc cag gct cca acg aag ggt ctg	192
Ser Asn Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Thr Lys Gly Leu	
50 55 60	

gag tgg gtc gca tac att agt agt ggt ggt ggt agc act tac tat cga	240
Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Arg	

65	70	75	80	
gac tcc gtg aag ggc cga ttc act atc tcc aga gat aat gca aaa agc				288
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser				
	85	90	95	
acc ctg tac ctg caa atg gac agt ctg agg tct gag gac acg gcc act				336
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr				
	100	105	110	
tat tac tgt aca aca gag gac tat ggg tat tgg ttt gct tac tgg ggc				384
Tyr Tyr Cys Thr Thr Glu Asp Tyr Gly Tyr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly				
	115	120	125	
caa ggc act ctg gtc act gtc tct tca				411
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser				
	130	135		
<210> 2				
<211> 137				
<212> PRT				
<213> Rattus norvegicus				
<400> 2				
Met Asp Ile Arg Leu Ser Leu Val Phe Leu Val Leu Phe Ile Lys Gly				
1	5	10	15	
Val Gln Cys Glu Val His Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln				
	20	25	30	
Pro Gly Arg Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe				
1	5	10	15	
Ser Asn Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Thr Lys Gly Leu				
	20	25	30	
Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Arg				
	35	40	45	
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser				
	50	55	60	

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr
 65 70 75 80

Tyr Tyr Cys Thr Thr Glu Asp Tyr Gly Tyr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
 85 90 95

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 100

<210> 3

<211> 387

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(387)

<400> 3

atg gat ttt cag gtg cag agt ttc agc ctc ctg cta atc agt atc aca 48
 Met Asp Phe Gln Val Gln Ser Phe Ser Leu Leu Leu Ile Ser Ile Thr
 1 5 10 15

gtc ata gtg tcc agt gga gaa att gtg ctc acc cag tct cca aca acc 96
 Val Ile Val Ser Ser Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Thr Thr
 20 25 30

atg gct gca tct cca gga gag aag gtc acc atc acc tgc cgt gcc agc 144
 Met Ala Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
 35 40 45

tca agt gta agc tac atg cac tgg ttc cag cag aag tca ggc acc tcc 192
 Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Phe Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser
 50 55 60

ccc aaa ccc tgg att tat ggc aca tcc aag ctg gct tct gga gtc cca 240
 Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Gly Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro
 65 70 75 80

gat cgc ttc agt ggc agt ggg tct ggg acc tct tat tct ctc aca atc 288
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
 85 90 95

agc tcc atg gag gct gaa gat gct gct act tat tac tgt ctg cag agg 336
 Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Arg
 100 105 110

agt agt tac cca ccc acg ttt gga gct ggg acc aag ctg gaa ctg aaa 384
 Ser Ser Tyr Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 115 120 125

cgg 387
 Arg

<210> 4

<211> 129

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 4

Met Asp Phe Gln Val Gln Ser Phe Ser Leu Leu Leu Ile Ser Ile Thr
 1 5 10 15

Val Ile Val Ser Ser Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Thr Thr
 20 25 30

Met Ala Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
 35 40 45

Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Phe Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser
 50 55 60

Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Gly Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro
 65 70 75 80

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
 85 90 95

Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Arg
 100 105 110

Ser Ser Tyr Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 115 120 125

Arg

<210> 5

<211> 5

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 5

Asn Tyr Tyr Met Thr

1

5

<210> 6

<211> 17

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 6

Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val Lys

1

5

10

15

Gly

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 7

Glu Asp Tyr Gly Tyr Trp Phe Ala Tyr

1

5

<210> 8

<211> 10

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 8

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His

1

5

10

<210> 9
<211> 7
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 9
Gly Thr Ser Lys Leu Ala Ser
1 5

<210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 10
Leu Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Pro Thr
1 5

<210> 11
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 11
taaagaattc gcggccgctc tccc 24

<210> 12
<211> 49
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 12
taaagtcgac gggcccttgg tggaggctga agagacagt accagagt 49

<210> 13

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 13

taaagaattc tccaaacttc aagtacacaa tgg

33

<210> 14

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 14

taaagtcgac cgtacgttc agttccagct tggtc

35

<210> 15

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 15

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1

5

10

15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr

20

25

30

Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35

40

45

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val

50

55

60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Glu Asp Tyr Gly Tyr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 16

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 16

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45

Gly Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu
 65 70 75 80

Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Pro Thr
 85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 17

<211> 18
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 17
 Gly Pro Glu Thr Leu Ser Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe
 1 5 10 15

Val Cys

<210> 18
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 18
 Cys Leu Gln Phe Val Ala Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro
 1 5 10 15

Thr Gly

<210> 19
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 19
 Cys Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser
 1 5 10

<210> 20
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 20
 Cys Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser Arg Arg Ala Pro Gln Thr
 1 5 10

<210> 21

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Arg Arg Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val Asp Glu Cys

1

5

10

<210> 22

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Cys Thr Gly Ile Val Asp Glu Ala Ala Phe Arg Ser Ala Asp Leu Arg

1

5

10

15

Arg

<210> 23

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Ala Ala Pro Leu Lys Pro Ala

1

5

10

15

Lys Ser Ala

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys

1

5

<210> 25

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala Lys Ser Ala

1 5

<210> 26

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Cys Thr Gly Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser Cys Asp Leu Arg

1 5 10 15

Arg

<210> 27

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 27

gatgaattca gaagcaatgg gaaaaatcag cagtc

35

<210> 28

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 28



cattgtcgac gcatgtcact cttcactcct ca

32

出願人又は代理人の書類記号	1482	国際出願番号	PCT/JP03/05505
---------------	------	--------	----------------

寄託された微生物に関する表示
〔PCT規則13の2〕

A. 以下に示される表示は、明細書中に言及されている微生物に関するものである。	
28	4
頁、 行	
B. 寄託の表示 他の寄託が別紙に記載されている <input type="checkbox"/>	
寄託機関の名称 独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター	
寄託機関のあて名（郵便番号及び国名を含む） 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6（郵便番号 305-8566）	
寄託の日付 26.03.02	受託番号 FERM BP-7978
C. 追加の表示（該当しない場合には記載しない） この情報は別紙に続いている <input type="checkbox"/>	
ヨーロッパ特許が求められているそれぞれの指定国については、寄託微生物の標本の分譲は欧州特許を付与する旨の告示が公表されるまで、又は欧州特許出願が拒絶され、取下げられ若しくは取下げられたとみなされる日まで標本の請求人により指名された専門家に分譲することによってのみ可能である（Rule 28 (4) EPC）。	
D. この表示を行うための指定国（すべての指定国のために行わない場合）	
E. 追加事項の表示の届出（該当しない場合には記載しない）	
下記の表示は後に国際事務局に届け出る予定である。（例えば「受託番号」のように表示事項を明記する）	


受理官庁記入欄
<input checked="" type="checkbox"/> この用紙は国際出願とともに受理した
権限のある職員  

国際事務局記入欄
<input checked="" type="checkbox"/> この用紙が国際事務局に受理された日 23 MAY 2003
権限のある職員 中村 由香里

出願人又は代理人の書類記号	1482	国際出願番号	PCT/JP03/05505
---------------	------	--------	----------------

寄託された微生物に関する表示
〔PCT規則13の2〕

A. 以下に示される表示は、明細書中に言及されている微生物に関するものである。	
69	27
頁、 行	
B. 寄託の表示 他の寄託が別紙に記載されている <input type="checkbox"/>	
寄託機関の名称 独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター	
寄託機関のあて名（郵便番号及び国名を含む） 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6（郵便番号 305-8566）	
寄託の日付 02.04.02	受託番号 FERM BP-7996
C. 追加の表示（該当しない場合には記載しない） この情報は別紙に続いている <input type="checkbox"/>	
<p>ヨーロッパ特許が求められているそれぞれの指定国については、寄託微生物の標本の分譲は欧州特許を付与する旨の告示が公表されるまで、又は欧州特許出願が拒絶され、取下げられ若しくは取下げられたとみなされる日まで標本の請求人により指名された専門家に分譲することによってのみ可能である（Rule 28 (4) EPC）。</p>	
D. この表示を行うための指定国（すべての指定国のために行わない場合）	
E. 追加事項の表示の届出（該当しない場合には記載しない）	
下記の表示は後に国際事務局に届け出る予定である。（例えば「受託番号」のように表示事項を明記する）	

受理官庁記入欄
<input checked="" type="checkbox"/> この用紙は国際出願とともに受理した
権限のある職員 

国際事務局記入欄
<input checked="" type="checkbox"/> この用紙が国際事務局に受理された日 23 MAY 2003
権限のある職員 中村 由香里

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/05505

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C07K16/22, C12N15/09, C12P21/08, C12N1/21, C12N5/10,
A61K39/395, A61P3/10, A61P9/10, A61P13/12, A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C07K16/22, C12N15/09, C12P21/08, C12N1/21, C12N5/10,
A61K39/395, A61P3/10, A61P9/10, A61P13/12, A61P35/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), GenBank/EMBL/DBJ, Geneseq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Dai Z. et al., Creation of an autocrine model of insulin-like growth factor-I action in transfected FRTL-5 cells., Endocrinology., 1992, Vol.130, No.6, p. 3175-83	1-24
Y	Laubli UK, Monoclonal antibodies directed to human insulin-like growth factor I (IGF I). Use for radioimmunoassay and immunopurification of IGF., FEBS Lett., 1982, Vol.149, No.1, p.109-12	1-24
Y	EP 292656 A1 (MALLINCKRODT INC.), 30 November, 1988 (30.11.88), & JP 1-3561 A & AU 8812321 A & JP 2665503 B2	1-24

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
---	--

Date of the actual completion of the international search
30 July, 2003 (30.07.03)

Date of mailing of the international search report
12 August, 2003 (12.08.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/05505

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Enjoh T. et al., Characterization of new monoclonal antibodies to human insulin-like growth factor-II and their application in western immunoblot analysis., J.Clin.Endocrinol.Metab., 1993, Vol.77, No.2, p.510-7	1-24
Y	EP 492552 A1 (DAIICHI PHARM CO., LTD.), 01 July, 1992 (01.07.92), & NO 9105017 A & JP 5-252987 A & NO 302526 B1 & JP 3213359 B2	1-24
Y	WO 85/00831 A (AMGEN), 28 February, 1985 (28.02.85), & EP 135094 A & JP 60-501989 A & EP 406913 A	1-24
Y	Lemonerie T. et al., IGF-2 autocrine stimulation in tumorigenic clones of a human colon-carcinoma cell line., Int.J.Cancer., 1995, Vol.61, No.4, p.587-92	1-24
Y	Riechmann L. et al., Reshaping human antibodies for therapy., Nature, 1988, Vol.332, No.6162, p.323-7	3-24

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int Cl ⁷ C07K16/22, C12N15/09, C12P21/08, C12N1/21, C12N5/10, A61K39/395, A61P3/10, A61P9/10, A61P13/12, A61P35/00		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int Cl ⁷ C07K16/22, C12N15/09, C12P21/08, C12N1/21, C12N5/10, A61K39/395, A61P3/10, A61P9/10, A61P13/12, A61P35/00		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), GenBank/EMBL/DDBJ/Geneseq		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Dai Z et al, Creation of an autocrine model of insulin-like growth factor-I action in transfected FRTL-5 cells., Endocrinology., 1992, Vol. 130, No. 6, p. 3175-83.	1-24
Y	Laubli UK, Monoclonal antibodies directed to human insulin-like growth factor I (IGF I). Use for radioimmunoassay and immunopurification of IGF., FEBS Lett., 1982, Vol. 149, No. 1, p. 109-12.	1-24
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 30.07.03	国際調査報告の発送日 12.08.03	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 六笠 紀子 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B 9735

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	EP 292656 A1 (MALLINCKRODT INC) 1988.11.30 &JP 1-3561 A &AU 8812321 A &JP 2665503 B2	1-24
Y	Enjoh T et al, Characterization of new monoclonal antibodies to human insulin-like growth factor-II and their application in western immunoblot analysis., J Clin Endocrinol Metab., 1993, Vol. 77, No. 2, p. 510-7.	1-24
Y	EP 492552 A1 (DAIICHI PHARM CO LTD) 1992.07.01 &NO 9105017 A &JP 5-252987 A &NO 302526 B1 &JP 3213359 B2	1-24
Y	WO 85/00831 A (AMGEN) 1985.02.28 &EP 135094 A &JP 60-501989 A &EP 406913 A	1-24
Y	Lamonerie T et al, IGF-2 autocrine stimulation in tumorigenic clones of a human colon-carcinoma cell line., Int J Cancer., 1995, Vol. 61, No. 4, p. 587-92.	1-24
Y	Riechmann L et al, Reshaping human antibodies for therapy., Nature, 1988, Vol. 332, No. 6162, p. 323-7.	3-24

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☒ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.